



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Preservación miceliar de basidiomicetes procedentes de regiones tropicales y  
temperadas en granos de maíz y de cebada**

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en**

**Ciencias Biológicas**

**KATHERINE ESTEFANIA PADILLA ARIAS**

**Quito, 2017**

## **CERTIFICACIÓN**

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Katherine Estefanía Padilla Arias ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Carlos. A. Soria, PhD

Director de la Disertación

Quito, 26 de enero de 2017

## **DEDICATORIA**

A la naturaleza y su belleza, desde los pequeños detalles hasta las grandes maravillas, entre ellas el corazón de los seres, que a pesar de las caídas, siguen brillando como estrellas.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Pontificia Universidad Católica y al laboratorio de Bioquímica 112 por haber financiado este proyecto y permitido concluir esta etapa.

A mis padres que se han esforzados a lo largo de estos años para poder darme el regalo de la educación. A toda mi familia que siempre ha estado presente compartiendo a cada momento, haciendo la vida más alegre. A mi abuelita por su amor incondicional.

A mi director de tesis, Dr. Carlos A. Soria, por haberme dado el espacio y la guía para desarrollar mis habilidades.

A mi profesora Ph. D. María Eugenia Ordoñez por haberme llevado a mí el conocimiento del mundo de los hongos y brindarme siempre su apoyo.

Al Mgtr. Pablo Pozo y la escuela de Ciencias Químicas de la PUCE, por la ayuda brindada para poder concluir este trabajo.

A mis amigos y compañeros de laboratorio que me ayudaron para continuar adelante y me brindaron su apoyo y conocimiento, Andrés, Cris, Yamara, Ely, Jorge, Andre, Carlita, Nelson, David. A mis amigas Dani y Grace por ser incondicionales y estar presentes en las buenas y en las malas. A mis compañeros Michelle, Pao, Josué y Gaby por compartir conmigo esta experiencia tan bonita de estudiar la naturaleza.

A todas las personas que han sido parte de mi vida, gracias por su apoyo a lo largo de la carrera.

Al universo por haberme traído hasta este punto de mi vida.

Muchas Gracias.

## TABLA DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	III.
DEDICATORIA.....	IV.
AGRADECIMIENTOS.....	V.
TABLA DE CONTENIDOS.....	VI.
LISTA DE FIGURAS.....	IX.
LISTA DE TABLAS.....	X.
LISTA DE ANEXOS.....	XII.
1. RESUMEN.....	13
2. ABSTRACT.....	14
3. INTRODUCCIÓN.....	15
3.1. ANTECEDENTES.....	15
3.2. APLICACIONES DEL REINO FUNGI.....	15
3.3. CRECIMIENTO MICELIAR.....	18
3.4. NUTRICIÓN Y DESCOMPOSICIÓN.....	19
3.5. PRESERVACIÓN MICELIAR.....	20
3.5.1. METODOS DE PRESERVACIÓN MICELIAR.....	21
3.5.2. PRESERVACION DE BASIOMICETES.....	23
3.6. OBJETIVOS.....	25

3.6.1. OBJETICO GENERAL.....	25
3.6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
4.1. METODOLOGÍA DE PRESERVACIÓN DEL CULTIVO MICELIAR .....	26
4.1.1. PREPARACIÓN DE CULTIVOS PUROS.....	26
4.1.2. PREPARACIÓN DEL SUSTRATO.....	27
4.1.3. INOCULACIÓN.....	27
4.1.4. ALMACENAMIENTO.....	27
4.2. EVALUACIÓN DE LA METODOLOGÍA IMPLEMENTADA.....	28
4.2.1. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y PUREZA.....	29
4.2.2. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD MORFOLÓGICA DE LOS CULTIVOS ALMACENADOS.....	29
4.3. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE LOS COMPONENTES EXTRACTURALES DE GRANOS DE MAÍZ Y CEBADA. ....	30
4.3.1. PREPARACIÓN DEL LAS MUESTRAS.....	30
4.3.2. DETERMINACIÓN DE LIGNINA.....	30
4.3.3. DETERMINACIÓN DE CELULOSA.....	31
4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	32
5. RESULTADOS .....	33
5.1. VIABILIDAD Y PUREZA .....	33
5.1.1. ALMACENAMIENTO EN MAÍZ Y CEBADA A 4°C Y -80°C POR 2,5 Y 10 MESES.....	33

5.1.2. ALMACENAMIENTO A 4°C POR 10 Y 12 MESES EN MAÍZ Y CEBADA.....	34
5.2. ESTABILIDAD MORFOLOGÍA DEL CRECIMIENTO MICELIAR .....	35
5.2.1. ALMACENAMIENTO EN MAÍZ Y CEBADA A 4°C Y -80°C POR 2,5 Y 10 MESES.....	35
5.2.1.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL MICELIO.....	35
5.2.1.2. TASA DE CRECIMIENTO MICELIAR.....	36
5.2.2. ALMACENAMIENTO A 4°C POR 10 Y 12 MESES EN MAÍZ Y CEBADA.....	40
5.2.2.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL MICELIO.....	40
5.2.2.2. TASA DE CRECIMIENTO MICELIAR.....	40
5.3. CONTENIDO DE LIGNINA Y CELULOSA EN GRANOS DE MAÍZ Y CEBADA.....	41
6. DISCUSIÓN.....	42
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	50
8. LITERATURA CITADA.....	52
9. FIGURAS.....	59
10. TABLAS.....	71
11. ANEXOS.....	85



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Colonización del micelio en granos de cebada.....	59
<b>Figura 2.</b>	Cultivo miceliar listo para ser almacenado a 4°C y -80°C.....	60
<b>Figura 3.</b>	Preparación de muestra libre de extraíbles.....	61
<b>Figura 4.</b>	Determinación de lignina.....	62
<b>Figura 5.</b>	Determinación de celulosa.....	63
<b>Figura 6.</b>	Cultivo miceliar a las 96 y 336 horas de las cepas J16, H8, K17.....	64
<b>Figura 7.</b>	Cultivo miceliar a las 96 y 336 horas de las cepas L18, S21, R22.....	65
<b>Figura 8.</b>	Cultivo miceliar a las 96 y 336 horas de las cepas N9, P14, A3.....	66
<b>Figura 9.</b>	Cultivo miceliar a las 96 y 336 horas de las cepas B4, C5, G11.....	67
<b>Figura 10.</b>	Cultivo miceliar a las 96 y 336 horas de las cepas D6, E7, F10.....	68
<b>Figura 11.</b>	Cultivo miceliar a las 96 y 336 horas de las cepas I20, M1, O13.....	69

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Lista de las especies comerciales y ecuatorianas con su código de cepa, hábitat, morfología del crecimiento miceliar y nutrición.....	70
<b>Tabla 2.</b>	Grupos formados por cepas de acuerdo al tiempo, temperatura y grano en que fueron almacenadas.....	73
<b>Tabla 3.</b>	Análisis, diseño y prueba estadística aplicada para los datos de la tasa de crecimiento miceliar por día de cada cepa del grupo 1 y 2, después de ser almacenadas a las temperaturas de 4°C y -80°C por 2, 5 y 10 meses.....	74
<b>Tabla 4.</b>	Viabilidad y pureza de las cepas del grupo 1 después de ser almacenadas a las temperaturas de 4°C y -80°C por 2 y 10 meses. ....	75
<b>Tabla 5.</b>	Viabilidad y pureza de las cepas del grupo 2 después de ser almacenadas a las temperaturas de 4°C y -80°C por 2 y 5 meses.....	76
<b>Tabla 6.</b>	Viabilidad y pureza de las cepas almacenadas a 4°C por 10 meses (grupo 3) y 12 meses (grupo 4) en granos de maíz y cebada.....	77
<b>Tabla 7.</b>	Promedio de la tasa de crecimiento miceliar por día (mm) de las cepas del grupo 1 después de ser almacenadas a las temperaturas de 4°C y -80°C por 2 y 10 meses.....	78
<b>Tabla 8.</b>	Promedio de la tasa de crecimiento miceliar por día (mm) de las cepas del grupo 2 después de ser almacenadas a las temperaturas de 4°C y -80°C por 2 y 5 meses.....	79
<b>Tabla 9.</b>	Resultado del análisis estadístico paramétrico independiente por cepa para la tasa de crecimiento miceliar por día de las cepas del grupo 1 y 2 después de ser almacenadas a las temperaturas de 4°C y -80°C por 2, 5 y 10 meses.....	80
<b>Tabla 10.</b>	Resultado estadístico de las pruebas no paramétricas realizado independientemente por cepa para la tasa de crecimiento miceliar por día de las cepas del grupo 1 después de ser almacenadas a las temperaturas de 4°C y -80°C por 2 y 10 meses.....	81
<b>Tabla 11.</b>	Resultado estadístico de las pruebas no paramétricas realizado independientemente por cepa para la tasa de crecimiento miceliar por día de las	

cepas del grupo 2 después de ser almacenadas a las temperaturas de 4°C y -80°C por 2 y 5 meses.....82

**Tabla 12.** Promedio de la tasa de crecimiento miceliar por día de cepas después de ser almacenadas en granos de maíz y cebada, a la temperatura de 4°C por 10 (grupo 3) y 12 meses (grupo 4)..... 83

**Tabla 13.** Porcentaje de lignina y celulosa en granos de maíz y cebada.....84

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b>	Representación esquemática de la organización estructural de los diferentes biopolímeros de la pared celular de una angiosperma no leñosa.....	85
<b>Anexo 2.</b>	Estructura y composición de la fibra de celulosa.....	86
<b>Anexo 3.</b>	Estructura de la lignina.....	87

## 1. RESUMEN

El objetivo de preservar cultivos miceliares es mantenerlos en forma estable y viable a través de largos periodos de tiempo, sin cambios en sus características genotípicas, fenotípicas y fisiológicas. El presente estudio tiene como objetivo desarrollar una metodología de preservación micelar de basidiomicetes procedentes de regiones tropicales y templadas en granos de maíz y cebada a 4 °C o -80 °C. Granos de maíz y cebada fueron preparados con 1,5% de sulfato de calcio ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 70% de agua y esterilizados a 121°C por 45 minutos. El sustrato resultante fue inoculado con micelio correspondiente a cada especie de hongo, luego incubado, y una vez colonizado fue almacenado a 4°C y -80°C. Las cepas crecidas en maíz fueron almacenadas a 4°C y -80°C, por 2, 5 y 10 meses, mientras que otras almacenadas en cebada o maíz se preservaron a 4 °C por 10 y 12 meses. Después del periodo de preservación las cepas almacenadas se sub-cultivaron en agar nutritivo. Para probar la eficacia del método de conservación se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: Viabilidad, pureza del cultivo y estabilidad genética; esta última fue estimada por la morfología y la tasa de crecimiento micelar (mm/día). El porcentaje de lignina y celulosa en granos de maíz y cebada se determinó por análisis bioquímicos y se relacionó con la tasa de crecimiento de los hongos. Se realizó análisis estadísticos para cada cepa guardada a las dos temperaturas. Diez y ocho cepas fueron almacenadas bajo esta metodología. Todas las cepas fueron viables después del almacenamiento en cualquiera de las dos temperaturas, en uno de los tiempos almacenados, o a uno de los dos tipos de grano. Se consideró que ambas temperaturas de almacenamiento son métodos de conservación parcialmente exitosos, sin embargo, se encontró que a -80°C la viabilidad y las características morfológicas se mantienen mejor. Se encontraron diferencias significativas en la tasa de crecimiento micelar, siendo mayor en cuatro de las cepas almacenadas a -80°C. Se obtuvieron mejores tasas de crecimiento en maíz que en cebada, aunque el porcentaje de lignina y celulosa fue mayor en cebada que en maíz.

Palabras clave: Basidiomicetes, clima tropical y templado, cultivo micelar, granos de maíz y cebada, preservación.

## 2. ABSTRACT

The objective of preserving mycelium cultures is to maintain them in a stable and viable way over long periods of time, without changes in their genotypic, phenotypic and physiological characteristics. The present study aims to develop a methodology for mycelium preservation of basidiomycetes from tropical and temperate regions in maize and barley grains at 4°C or -80°C. Maize and barley grains were prepared with 1.5% calcium sulfate ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 70% water, sterilized at 121°C for 45 minutes. The resulting substrate was inoculated with mycelium corresponding to each of the fungal species, then incubated and once colonized it was stored at 4°C and -80°C. Strains preserved in maize were stored at 4°C and -80°C for 2, 5 and 10 months, while others were stored either on barley or maize at 4°C for 10 and 12 months. After the preservation period the stored strains were subcultured on nutrient agar after the preservation period. To test the effectiveness of the conservation method, the following parameters were taken into account: viability, culture purity and genetic stability; the latter was estimated by the morphology and mycelium growth rate (mm/day). The percentage of lignin and cellulose in maize and barley grains was determined by biochemical analysis and was related to the growth rate of the fungus. Statistical analyzes were performed for each strain stored at both temperatures. Eighteen strains were stored under this methodology. All strains were viable after storage at either of the two temperatures, at one of the stored times, or at one of the two grain types. Both storage temperatures were considered to be partially successful methods of conservation, however, it was found that at -80°C the viability as well as the morphological characteristics were better maintained. Significant differences were found for the mycelium growth rate, being higher in four of the stored at -80°C. Better growth rates were found on maize than on barley, even though the percentage of lignin and cellulose was higher in barley as compared with maize.

Key words: Basidiomycetes, corn grains and barley, mycelial cultivation, tropical and temperate climate, preservation.

### **3. INTRODUCCIÓN**

#### **3.1. ANTECEDENTES**

Los hongos son organismos muy diversos y poco conocidos, se estima que la diversidad de hongos en el mundo es de alrededor de 5,1 millones de especies, de las cuales solamente se han descrito aproximadamente 99 000, lo que representa apenas el 1,9% de hongos a nivel mundial. Por lo tanto se justifica su estudio debido a la necesidad de identificar especies de hongos y sus posibles aplicaciones biotecnológicas en beneficio no solo del hombre sino de la tierra (Hawksworth, 1999; Blackwell, 2011).

Los hongos conocidos principalmente como organismos descomponedores son esenciales en el funcionamiento de los ecosistemas encargados de degradar la materia orgánica, reciclan los nutrientes, devolviendo el carbono, hidrógeno, nitrógeno y otros minerales al suelo, en formas en las que pueden ser aprovechados nuevamente por plantas, insectos y otros organismos (Stamets, 2000).

#### **3.2. APLICACIONES DEL REINO FUNGI**

Las aplicaciones biotecnológicas de este grupo de organismos son extensas. Desde décadas atrás han sido usados en la fermentación de bebidas alcohólicas, la elaboración de pan, hasta la obtención de la penicilina y otros antibióticos (Finkelstein y Ball, 2013). En la actualidad, en particular hongos basidiomicetes de importancia en este estudio, son investigados por sus propiedades en campos como la medicina, la industria farmacéutica, la industria papelera, en la producción de alimentos, producción de biocombustibles, innovación de nuevos materiales, bioconstrucción, biocontrol y biorremediación (Stamets, 2000; Berrin et al., 2012; Kent y Chang, 2013, Lopes et al., 2015).

La característica de descomponedores dota a los hongos de una ventaja para la reutilización de materiales y su bioconversión. La lignocelulosa es uno de los compuestos más abundantes en la tierra representando el 50% de la biomasa total. Esta materia

lignocelulósica generada como desecho por las industrias puede ser usada para la fabricación de biocombustibles hasta la producción de hongos comestibles y medicinales (DaSilva, Ratledge y Sasson, 1992).

Hongos comestibles son considerados alimentos saludables debido a que poseen entre 19 a 35% de proteína y todos los aminoácidos esenciales para el ser humano, además de vitaminas (B1, B2, C), minerales, ácidos grasos insaturados y fibra (Molina, Montoya, Wilches y Benítez, 2013; Oei, 2016). Por esta razón, los hongos son considerados como una de las opciones más viables y económicas para la salud alimentaria, ya que pueden ser cultivados en desechos de paja de cereales, bagazo de caña, en desechos de fibras como algodón y otros (DaSilva et al., 1992).

Los hongos son considerados una fuente de compuestos con propiedades antibióticas, antitrombóticas, antidiabéticas, reductoras de colesterol e hipertensión, antitumorales e inmunomoduladoras (Chang y Miles, 2004). Al estar en continua competencia con otros organismos sintetizan una amplia gama de metabolitos. Contienen una diversidad de compuestos biológicamente activos que han demostrado científicamente poseer un amplio espectro de actividades farmacológicas (Pohleven, Korošec y Gregori, 2016). Fenoles han sido reportados en una variedad de hongos los cuales poseen actividad antioxidante y antimicrobiana (Mallavadhani et al., 2006; Tsai, Tsai y Mau, 2007).  $\beta$ -glucanos derivados de hongos han sido aprobados como medicamentos contra el cáncer y empleados clínicamente en Japón, tales como el PSK de *Trametes versicolor* (Pohleven et al., 2016).

*Lentinula edodes* o shiitake, es ahora ampliamente cultivado en todo el mundo con la segunda producción más alta entre los hongos comestibles (Bisen, Baghel, Sanodiya, Thakur y Prasad, 2010). Representa es una fuente de varios compuestos con actividad farmacológica demostrada, incluyendo los extractos LEM, LAP, KS-2 y la proteína lentinan aprobado en Japón como adyuvante en el tratamiento del cáncer gástrico, y la eritadenina, un metabolito secundario que reduce los niveles de lípidos en la sangre (Powell, 2010).



En *Ganoderma lucidum* conocido como el hongo de la inmortalidad, se ha identificado una diversidad de aproximadamente 400 compuestos biológicamente activos. Los más importantes desde el punto de vista farmacológico son los polisacáridos y triterpenos de los cuales se han encontrado en este hongo aproximadamente 200 y 130 respectivamente (Wachtel-Galor, Yuen, Buswell y Benzie, 2011). Numerosos estudios científicos han confirmado sus propiedades medicinales para la prevención y el tratamiento de enfermedades como: hipertensión, diabetes, cáncer, hepatitis, artritis, hipercolesterolemia, bronquitis, asma, gastritis y VIH (Moreno, Martinez y Fujimoto, 2011; Wachtel-Galor et al., 2011). Otras especies del género también son reconocidas como productores de componentes con funciones farmacológicas como: *G. tsugae*, *G. sinense*, *G. applanatum*, *G. multipileum*, *G. australe*, *G. capanense* y *G. sichuanense* (Zhou, Lin, Yin y Zhao, 2007; Wang, Wu, Su, Shih y Chen, 2009).

El género *Pleurotus* posee compuestos que fortalecen el sistema inmunológico, reducen la presión arterial y los niveles de azúcar en la sangre, actividad hepatoprotectora, antitumoral y antioxidante (Guzmán, Zúñiga, Santafé, Torres y Angulo, 2009; Pohleven, 2016). Estudios clínicos han demostrado que *P. ostreatus* reduce los niveles de colesterol y triglicéridos, sin ningún efecto deletéreo sobre el hígado y el riñón (Khatun, Mahtab, Khanam, Sayeed y Khan, 2007). Esta actividad es atribuida al compuesto activo lovastatina que combinada con fibra dietética inhibe la síntesis de colesterol (Gunde-Cimerman y Plemenitas, 2001). Además, se ha demostrado que el pleurano y los polisacáridos relacionados de *P. ostreatus*, poseen propiedades antitumorales y antivirales (Pohleven et al., 2016).

Hongos basidiomicetes pueden ser usados en la biorremediación de suelos contaminados por compuestos como PAHs (hidrocarburos aromáticos policíclicos), PCBs (bifenilos policlorados), PCPs (pentaclorofenoles), metales pesados, herbicidas y pesticidas. El micelio produce enzimas extracelulares que descomponen el material lignocelulósico, estas mismas enzimas reducen los hidrocarburos y toxinas manufacturadas. Otra aplicación que se da gracias al potencial del micelio es la micofiltración, en la cual el micelio no solo fracciona compuestos en nitrógeno y carbono sino que también atrapa bacterias, nemátodos y otros microorganismos (Lopes et al., 2015; Oei, 2016).

### 3.3. CRECIMIENTO MICELIAR

La unidad estructural y funcional de los hongos son las hifas. Una hifa es una célula filamentosa, la cual se multiplica por divisiones mitóticas sucesivas formando una red llamada micelio. Hongos basidiomicetes se caracterizan por presentar dos fases de crecimiento: una la fase vegetativa en la cual el micelio coloniza un sustrato con el objetivo de alimentarse y otra la fase reproductiva, en la cual hay formación de un cuerpo fructífero el que va contener estructuras especializadas, basidios donde se formaran esporas para la reproducción (Finkelstein y Ball, 2013).

A partir de una espora germinada o de una hifa el crecimiento miceliar es radial. Las especies difieren en la manera de proyectar esta red miceliar. Mientras el hongo coloniza un sustrato su crecimiento es vegetativo, este estado es el más largo de su ciclo de vida. Cuando los nutrientes se agotan o cuando se producen cambios ambientales, el micelio inicia la fase reproductiva (Oei, 2016).

Cada especie de hongo produce una forma reconocible de micelio el cual varía dentro de un rango de expresiones. Dentro de una especie, las varias cepas pueden diferenciarse drásticamente en su apariencia. Este rango de características cambian en forma, color, tasa de crecimiento, aroma e incluso formación de cuerpos fructíferos diminutos. Los cambios que se producen en estas características nos pueden indicar cuando un crecimiento es normal o anormal o cuando se ha producido una mutación (Malik, 1992; Stamets, 2000).

La forma del micelio se refiere a la apariencia macroscópica del hongo creciendo sobre una caja Petri con agar nutritivo, estas formas pueden ser categorizadas en varias formas clásicas, como micelio linear, rizomórfico, algodonoso, por zonas, enmarañado, polvoriento o con formaciones únicas. El color es otra característica visible, la mayoría de especies de hongos producen un micelio que cambia su pigmentación a medida que envejecen, van desde colores blancos, amarillos, tomates, rosados, cafés hasta azul y negro (Stamets, 2000).

### 3.4. NUTRICIÓN Y DESCOMPOSICIÓN

Los hongos presentan una alimentación heterótrofa, tienen una digestión externa, secretan una gran cantidad de enzimas hidrolíticas para poder degradar y luego asimilar los compuestos orgánicos. Los hongos pueden alimentarse a partir de azúcares simples, como la glucosa, sacarosa y maltosa, o de compuestos más complejos como el almidón y la celulosa (Finkelstein y Ball, 2003). Los hongos pueden ser saprofitos, parásitos y simbioses. Algunos hongos parásitos como *Ganoderma* pueden ser saprofitos después de que su hospedero muere. Los hongos de los géneros *Pleurotus* y *Lentinula* son saprofitos de la madera, son descomponedores estructurales de las células vegetales, que gracias a un conjunto específico de enzimas pueden romper compuestos como lignina y celulosa (Stamets, 2000). La descomposición de la madera a cargo de este tipo de hongos, se clasifica en los llamados tipos de pudrición (Joselau y Ruel, 1994; Carlile, Watkinson y Gooday, 2001).

En la pudrición café los hongos eliminan selectivamente la celulosa y la hemicelulosa de la madera dejando a la lignina ligeramente modificada. Los hongos de pudrición blanca, descomponen tanto lignina como celulosa a la misma velocidad, hongos del género *Pleurotus*, *Lentinula* y *Ganoderma* presentan esta pudrición (Adaskaveg, Gilbertson y Blanchette, 1990). Existen evidencias de que la energía requerida para la degradación de lignina es obtenida de fuentes accesibles como polisacáridos y azúcares de bajo peso molecular (Pinzón, 2004). La pudrición blanda es frecuente en ascomicetos, estos degradan preferentemente la celulosa (Schwarze, Engels y Mattheck, 2000).

Los principales componentes macromoleculares de las células vegetales son el almidón (utilizado como reserva energética) y los que componen la pared celular, constituidos por celulosa, hemicelulosa y pectina (Rodríguez, 2015). Los grano de maíz, trigo, arroz y cebada, presentan un contenido de almidón entre 60 a 75% (Cheng, 2010). La pared celular consiste de un 30 a 45% de celulosa, hemicelulosa de 25 a 30% y lignina de 15 a 20% (Barroso, 2010). La celulosa se encuentra entrelazada con la hemicelulosa por medio de puentes de hidrogeno, fuerzas de van der Waals y grupos acetyl formando una estructura en

red; la lignina se encuentra recubriendo esta red de celulosa y hemicelulosa (Wyman et al., 2005; Cuervo, Folch y Quiroz., 2009) (Anexo 1).

La celulosa es un homopolímero compuesto por unidades de glucosa con enlaces glucosídicos  $\beta$  1-4, posee una estructura lineal y fibrosa constituida por regiones cristalinas y amorfas (Sánchez, Gutiérrez, Muñoz y Rivera Barrero, 2010). La celulosa está formada por estructuras conocidas como microfibrillas, las que a su vez están conformadas por fibrillas formadas de 10000 y 14000 moléculas de glucosa (Barroso, 2010). Las enzimas celulolíticas que degradan la celulosa son la endoglucanasa, exoglucanasa y celobiasa, estas trabajan sinérgicamente (Lemaire, 1996) (Anexo 2).

La hemicelulosa es un polímero heterogéneo, ramificado y complejo formado por azúcares de cinco y de seis carbonos, con presencia de ácido glucurónico (Sánchez et al, 2010). Conformada por xilanos, mananos y glucamananos, unidos por enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 (Wyman et al., 2005; Cuervo et al., 2009). Las enzimas xilanolíticas son las encargadas de degradar la hemicelulosa (Rodríguez, 2015).

La lignina es un heteropolímero aromático ramificado de estructura tridimensional y amorfa, que está formado por varios ácidos y unidades de alcohol fenil-propano (p-coumaril, coniferil y sinapil alcohol) (Sánchez et al, 2010) (Anexo 3). La lignina actúa en la defensa natural de la planta en contra de la degradación enzimática impidiendo la entrada de otras enzimas a través de la pared celular (Sjostrom, 1993). Las enzimas que degradan la lignina son la lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP), y lacasas (Hatakka, 1994).

### **3.5. PRESERVACIÓN MICELIAR**

La preservación de los recursos genéticos en el tiempo es de gran importancia para la continua investigación de la biodiversidad, propiedades y usos que pueden tener organismos tan diversos como los hongos (Hawksworth, 2004). En los organismos de reproducción sexual su periodo de vida se encuentra limitado al número de divisiones celulares. Si no existe una recombinación genética, las líneas celulares perderán algunas características genéticas,

envejecerán y eventualmente morirán. En el caso del crecimiento miceliar, la división celular de los hongos excede el potencial de cualquier otro organismo. Aun así, las cepas mueren y si no se toman precauciones nunca podrán ser recuperadas (Stamets, 2000).

Lograr preservar una cepa es parte fundamental para poder realizar estudios posteriores con estos organismos. El principal objetivo de preservar una cepa es mantenerla en forma estable y viable durante periodos prolongados de tiempo, sin alterar sus características genotípicas, fenotípicas y fisiológicas, manteniéndola en un cultivo libre de otros microorganismos (Chang y Miles, 2004; Nakasone, Peterson y Jong, 2011).

Generalmente se atribuye la degeneración celular de una cepa en almacenamiento a factores como falta de nutrientes u oxígeno, infecciones, acumulación de productos tóxicos, alteración del pH y a la pérdida de los componentes esenciales de la célula (Oei, 2016). Aunque los factores exactos que afectan a la degeneración de los cultivos de hongos aún no se comprenden plenamente a nivel subcelular, un cultivo de buena calidad puede ser conservado adecuando las condiciones de crecimiento y técnicas empleadas para la preservación de cepas (Chang y Miles, 2004).

### **3.5.1 MÉTODOS DE PRESERVACIÓN MICELIAR**

Existen diversos métodos para preservar cultivos celulares, por seguridad, y con el fin de minimizar la probabilidad de que se pierdan las cepas, cada cepa debe mantenerse, cuando sea práctico, por lo menos por dos procedimientos diferentes. La elección del método de conservación depende de las especies de interés, los recursos disponibles y el objetivo del proyecto (Nakasone et al, 2011). Estos se pueden clasificar principalmente en métodos a largo y corto plazo (Croan, Burdsall y Rentmeester, 1999). Los métodos a largo plazo son los más eficientes ya que con ellos se paraliza el crecimiento de las células, pero estas no mueren. Aun así, no se puede descartar cambios originados por el método de preservación en sí mismo (García y Uruburu, 1991). Los métodos de conservación a largo plazo son la congelación y liofilización, con estos se minimiza el riesgo de cambio genético y los cultivos se mantienen metabólicamente inactivos (World Federation for Culture Collections, 2010).

En la conservación por congelación las células se guardan a temperaturas inferiores a 0°C con un agente crioprotector. Así las células al no disponer de agua en forma líquida no presentan crecimiento. Este es el mejor método de conservación pero presenta el inconveniente de requerir aparatos especiales y costosos, y también existe el peligro de que se produzca una falla en el sistema como la subida de la temperatura durante el almacenamiento (Nakesone et al, 2011). El uso de un agente crioprotector, previene que las células sufran algún daño en el momento de la congelación, en especial entre las temperaturas de -15 a -60°C por la formación de hielo, la migración de agua o la concentración de iones. El crioprotector más usado es el glicerol al 10-20%. Existen otras sustancias, como el DMSO, leche descremada y carbohidratos como glucosa o sacarosa. Otra alternativa para reducir las criolesiones es el uso de diferentes sustratos para el crecimiento micelial antes de la congelación. (Montavani, 2012).

Existen varios factores que influyen en la viabilidad y estabilidad de las células conservadas: 1) la edad de las células; 2) la velocidad de congelación y descongelación y; 3) la temperatura de almacenamiento. Se recomienda que los cambios de temperatura sean rápidos y que el almacenamiento sea a la temperatura más baja posible (García y Uruburu, 1991). Se puede sumergir los cultivos en nitrógeno líquido a temperatura de -195°C o en la fase gaseosa a -140°C. Otro método eficiente es el almacenamiento en ultracongeladora donde se alcanzan temperaturas por debajo de -70°C (American Type Culture Collections, 2011). En el caso de la liofilización es un proceso suave, la estabilidad genética es alta pero no tanto como en la congelación (Homolka, 2014).

El almacenamiento en agua destilada, sílica gel, aceite mineral, son usados para la preservación a corto plazo y permiten reducir el crecimiento y metabolismo. En algunos casos estos métodos son adecuados y ofrecen suficiente estabilidad genética (Croan et al., 1999). Se puede retardar el envejecimiento y alargar los periodos de sub-cultivos almacenando los aislados a temperaturas de 4 a 8°C. La conservación por suspensión en agua destilada es un método alternativo que permite alcanzar altos porcentajes de viabilidad a veces superiores a 5 años y la estabilidad de los caracteres morfológicos y fisiológicos es buena (García y Uruburu, 1991; Oei, 2016).

La transferencia periódica de una cepa a un nuevo medio de cultivo no permite la conservación del mismo sin perder la estabilidad genética. No se puede mantener una cepa por largo tiempo en el mismo medio ya que esta al seguir activa excreta productos tóxicos del metabolismo que se acumulan, provocando el envejecimiento y muerte celular. Al ser continuamente subcultivadas hay una alternancia de generaciones y al cabo de un tiempo las células que se guardan serán descendientes lejanas de las iniciales y posiblemente pierdan sus características, además existen altas probabilidades de contaminación (García y Uruburu, 1991; Homolka, 2014).

### **3.5.2 PRESERVACIÓN DE BASIDIOMICETES**

Las cepas de basidiomicetes son generalmente guardadas en tubos de ensayo con agar a temperatura ambiente. Stamets (2000) reporta que esta metodología para almacenamiento tiene máximo una vida útil de 6 a 12 meses, sin embargo si se someten a refrigeración a 1-2°C podrían sobrevivir 5 años o más. Ritcher (2008) reporta que el 88% de basidiomicetes saprofitos fueron viables después de 20 años de almacenamiento a 5°C.

Ryan, Smith y Jeffries (2000) informaron que ningún método puede aplicarse universalmente a todos los hongos y que si bien algunas especies son difíciles de preservar, otras pueden ser preservadas por casi cualquier método. Por ejemplo, la liofilización es inadecuada para la mayoría de los basidiomicetes (Homolka, 2014). Otros métodos están siendo desarrollados, enfocándose en el sustrato de almacenamiento como astillas de madera, granos, paja o papel filtro (Nakasone et al, 2011). Montavani (2012) mediante el almacenamiento en granos enteros de avena, trigo y arroz, con soluciones crioprotectoras logró una supervivencia de 1 a 3 años a temperaturas de -20 y -70°C para *P. ostreatus*.

Las cepas pueden mantenerse mediante la transferencia periódica a un medio nutritivo nuevo, este métodos es básico y de bajo costo, pero como se explicó anteriormente no permite mantener cultivos miceliares estables por periodos largos de tiempo (Oei, 2016). El tiempo entre repiques puede variar entre especies, pero generalmente se hacen a intervalos de 3 a 12 meses (Chang y Miles, 2004), siendo este periodo relativamente largo entre sub-

cultivos, sin embargo, existen reportes en zonas tropicales donde es necesario hacer subcultivos cada 25 a 30 días debido a que el agar en cajas petri se deseca. También se ha reportado que cepas tropicales necesitan ser subcultivadas máximo cada 3 a 4 meses aunque se encuentren bajo refrigeración (Veena y Meera, 2010).

Los basidiomicetes tropicales crecen bien en un medio nutritivo; sin embargo, estos se preservan muy pobremente o no lo hacen cuando se encuentran en agar nutritivo con agua destilada a 4°C. Bajo esta metodología hongos tropicales del género *Ganoderma* no pueden ser preservados en refrigeración a 4°C (Veena y Meera, 2010). La mayoría de aislados de basidiomicetes tropicales que han crecido en agar extracto de malta (MEA) no son viables después de dos meses a 4°C o después de seis meses a 8-10°C (Croan et al. 1999).

El desarrollo de metodologías para preservar estos hongos en periodos cortos y largos de tiempo es indispensable, en especial en el caso de basidiomicetes tropicales, los cuales pierden su viabilidad al ser expuestos a bajas temperaturas en comparación con cepas de climas templados (Croan et al 1999). Los basidiomicetes tropicales pueden conservarse a través de la criopreservación, el problema es que el nitrógeno líquido es caro, necesita reabastecimiento constante y por otra parte el procedimiento es laborioso (Veena y Meera, 2010).

El Ecuador al ser un país tropical, posee una gran diversidad micológica, que puede verse amenazada por la destrucción de la naturaleza. Por estos motivos tratar de conservar cepas nativas, así como cepas utilizadas en el desarrollo de la investigación científica es importante. Con este estudio se pretende evaluar una metodología que permita preservar eficazmente cultivos miceliares de diferentes hongos con posibles aplicaciones.



### **3.6. OBJETIVOS**

#### **3.6.1. OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar una metodología de preservación del cultivo miceliar de cepas de basidiomicetes comerciales y ecuatorianas de climas templados y tropicales manteniendo las cepas en forma estable y viable por periodos largos de tiempo.

#### **3.6.2. OBJETIVO ESPECÍFICO**

- Determinar la viabilidad y pureza de cepas de basidiomicetes comerciales y ecuatorianas de climas templados y tropicales, después de haber sido almacenadas por diferentes métodos de preservación miceliar.
- Evaluar la estabilidad del cultivo miceliar en base a la morfología y la tasa de crecimiento (mm/día) de las cepas estudiadas después de haber sido almacenadas por diferentes métodos de preservación miceliar.
- Comparar entre los diferentes métodos de preservación la viabilidad, pureza y estabilidad del cultivo miceliar de las cepas almacenadas.
- Cuantificar el porcentaje de lignina y celulosa presentes en granos de maíz y cebada.
- Relacionar los datos obtenidos en la determinación de lignina y celulosa con la tasa de crecimiento miceliar de las diferentes cepas probadas.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio se utilizaron seis cepas del género *Ganoderma*, dos comerciales y cuatro ecuatorianas; nueve cepas comerciales del género *Pleurotus*, una cepa comercial de *Hypsizygus ulmarius*, y dos cepas comerciales de *Lentinula edodes*. En la tabla 1 se enlistan las cepas con su correspondiente código de identificación y la especie a la que pertenecen, también se describe el hábitat, características del micelio y tipo de nutrición. Las cepas utilizadas para este estudio fueron proporcionadas por el Laboratorio de Bioquímica y el Fungario QCAM de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

### 4.1. METODOLOGÍA DE PRESERVACIÓN DEL CULTIVO MICELIAR

#### 4.1.1. PREPARACIÓN DE CULTIVOS PUROS

Para cada una de las cepas a ser almacenadas se propagaron los cultivos puros en cajas de Petri de 90 mm de diámetro. Para los hongos del género *Hypsizygus*, *Pleurotus* y *Lentinula* se utilizó agar malta (36 g/L) (MEA-Difco) y levadura (Difco) (2 g/L); mientras que para *Ganoderma* se usó PDA (39 g/L) (PDA-Difco) y levadura (Difco) (2 g/L), esta diferenciación de medios se debe a observaciones anteriores dentro del laboratorio, en donde se ha visto que cada grupo de cepas tiene crecimiento más rápido por estos medios.

Las cajas de Petri inoculadas con cada una de las cepas fueron incubadas en condiciones de oscuridad a 27°C para la mayoría de cepas, a excepción de las cepas de *Lentinula* las cuales se incubaron a 24°C, por ser la temperatura óptima de crecimiento (Stamets, 2000). Las cajas permanecieron en la incubadora hasta que colonicen toda la caja y fueron revisadas todos los días para verificar su crecimiento y descartar contaminaciones. Una vez multiplicado el cultivo puro se inoculó el sustrato de almacenamiento.

#### **4.1.2. PREPARACIÓN DEL SUSTRATO**

Se utilizaron granos de maíz y cebada como sustrato de almacenamiento. Los granos se colocaron separadamente en tubos Falcon de 50 ml o en frascos de vidrio (Boeco) de 100 ml y fueron mezclados con sulfato de calcio ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) al 1.5% del peso seco del grano (1.5 g/100 g de grano), para absorber la humedad extra y evitar que los granos se peguen (Stamets, 2000; Veena y Meera, 2010). Se colocó 70% de agua en relación al peso del grano seco y se esterilizó por 45 minutos en autoclave a 121°C y 15 psi.

Conjuntamente se esterilizaron crioviales de 1.5 ml y tubos de ensayo de 15 ml, para las pruebas a -80°C y a 4°C respectivamente. Una vez esterilizados los materiales, se deja enfriar el grano hasta que la temperatura sea adecuada para su inoculación.

#### **4.1.3. INOCULACIÓN**

La inoculación se realizó bajo una cámara de flujo laminar ESCO Optimair® para evitar contaminaciones. Se cortó, con la ayuda de un bisturí estéril, pequeños pedazos de agar colonizado del tamaño aproximado de 0.7 cm x 0.7 cm, que fueron transferidos a los crioviales y tubos de ensayo. Se formaron capas alternando los granos y pedazos de agar dentro de los tubos de ensayo estériles hasta llenar el 75% de su capacidad, y en crioviales hasta llenar el 90%. Cada uno fue identificado con el nombre de la cepa, valor p (generación) y fecha de inoculación. A los tubos de ensayo se les colocó papel aluminio estéril en lugar de las tapas, mientras que en los crioviales se dejó la tapa sin cerrar completamente para permitir el intercambio de aire. Posteriormente cada cepa fue incubada a su respectiva temperatura.

#### **4.1.4. ALMACENAMIENTO**

Las cepas conservadas en sustrato de maíz, fueron almacenados a una temperatura de 4°C y -80°C una vez que el hongo colonizó completamente. Las cepas preservadas en cebada fueron almacenadas a 4°C (Tabla 2) (Figura 1).

Los tubos de ensayo fueron almacenados a 4°C, previamente se realizó la esterilización de los tubos y sellados con parafilm. Los crioviales fueron almacenados a -80°C (ultracongelador), sin crioprotector (Figura 2). Este procedimiento fue realizado durante 18 meses.

## **4.2. EVALUACIÓN DE LA METODOLOGÍA IMPLEMENTADA**

Para evaluar el grado de efectividad de la metodología que se usó para almacenar las diferentes cepas se determinó la viabilidad, pureza y estabilidad morfológica del crecimiento miceliar. Para lo cual se restableció el crecimiento miceliar de las cepas después del almacenamiento a los diferentes tiempos y temperaturas. Se estableció cuatro grupos formados por cepas de acuerdo al tiempo, temperatura y grano en que fueron almacenadas. Las cepas que forman cada grupo se muestran en la tabla 3.

- GRUPO 1. Cepas que fueron almacenadas en granos de maíz a 4°C y -80°C en el tiempo de 2 y 10 meses.
- GRUPO 2. Cepas que fueron almacenadas en granos de maíz a 4°C y -80°C en el tiempo de 2 y 5 meses.
- GRUPO 3. Cepas que fueron almacenadas a 4°C en el tiempo de 10 meses en granos de maíz y cebada.
- GRUPO 4. Cepas que fueron almacenadas a 4°C en el tiempo de 12 meses en granos de maíz y cebada.

El restablecimiento del crecimiento miceliar de cada cepa se llevó a cabo tomando una copia a partir del almacenamiento a 4°C y -80°C y se llevó a temperatura ambiente. La inoculación se llevó a cabo en la cámara de flujo y con mechero Bunsen. Los granos colonizados fueron sacados de los tubos de ensayo y crioviales con la ayuda de una espátula estéril, y colocados sobre cajas Petri con agar previamente preparado, tomando en cuenta que dependiendo de la cepa el agar usado fue MEA o PDA. Un número de entre 2 a 6 granos se colocó en cada caja Petri para cepas que fueron almacenadas a 4°C y entre 2 a 4 granos para

cepas almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las cajas fueron selladas con parafilm, etiquetadas y llevadas a incubación en oscuridad a su respectiva temperatura dependiendo de la cepa.

Las cajas inoculadas fueron revisadas todos los días por una semana o hasta su completa colonización, se midió el crecimiento miceliar diariamente, se examinó la morfología del micelio y presencia de contaminaciones. Además, se realizó un registro fotográfico de las diferentes cepas de hongos.

#### **4.2.1. EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD Y PUREZA**

Para evaluar la viabilidad de cada cepa se tomó como respuesta positiva al crecimiento miceliar a partir del inóculo de grano y como respuesta negativa a la carencia de crecimiento, sin tomar en cuenta los días de latencia. De las cepas que mostraron crecimiento negativo se repitió el procedimiento, tomando otro tubo para confirmar la muerte del hongo.

En cuanto a la pureza del cultivo, se registró a las cepas que presentaron contaminaciones por otros hongos o bacterias, y se realizó una repetición del cultivo tomando otra copia del almacenamiento para verificar si la contaminación provino desde el cultivo almacenado o por algún otro factor.

#### **4.2.2. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD MORFOLÓGICA DE LOS CULTIVOS ALMACENADOS**

La estabilidad de los cultivos conservados se estimó evaluando la morfología y la tasa de crecimiento miceliar (mm/día) de cada cepa. La morfología del crecimiento miceliar se evaluó registrando todos los días las características como forma y color del micelio, y se realizó un registro fotográfico de las diferentes cepas. Las características morfológicas del micelio fueron comparadas con la literatura en el caso de cepas comerciales, y en el caso de cepas nativas se comparó con las características observadas en laboratorio de los aislados originales.

Además, de cada grano colocado en agar se midió el crecimiento miceliar diariamente con el calibrador digital Tresna ® (0-200 mm), tomando como dato el diámetro mayor de cada inóculo. A partir de estos datos registrados se obtuvo la tasa de crecimiento miceliar promedio (mm/día) de cada caja Petri que fue inoculada con los granos y el promedio de la tasa de crecimiento miceliar por cada cepa después de las diferentes condiciones de almacenamiento. Se comparó los datos obtenidos.

#### **4.3. DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE LOS COMPONENTES ESTRUCTURALES DE GRANOS DE MAÍZ Y CEBADA.**

Los análisis químicos se llevaron a cabo en el laboratorio de Microescala de la Escuela de Ciencias Químicas de la PUCE.

##### **4.3.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Se utilizó la metodología descrita en Prado et al. (2012) para la preparación de la muestra y determinación de la cantidad de lignina en los granos de maíz y cebada, por separado, con ciertas modificaciones. Primero se preparó el grano como si fuese a ser inoculado, con la metodología descrita en el punto 4.1.2. Los granos fueron secados en estufa a 65°C y molidos en molino eléctrico.

La muestra debe estar libre de extraíbles para la caracterización química, para lo cual se realizó una extracción Soxhlet durante 6 horas usando 210 ml de solvente, etanol: tolueno en proporciones 1:2, a continuación se lavó con etanol al 95% y se realizó una segunda extracción por 4 horas con 200 ml de etanol 95%. Después la muestra fue lavada con 750 ml de agua destilada y secada a temperatura ambiente (Figura 3).

##### **4.3.2. DETERMINACIÓN DE LIGNINA**

La determinación de lignina se realizó pesando 2 g de muestra anhidra libre de extraíbles en un vaso de 100 ml, se colocó 15 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 72% y se dejó reposar toda la

noche. Después se transfirió el contenido a un matraz bola y se colocó agua destilada hasta alcanzar una concentración de ácido al 3%. La solución se hirvió a reflujo por 4 horas, se decantó y filtró a través de un filtro Gooch de porosidad fina, previamente pesado. Finalmente el residuo fue lavado con agua caliente y secado a  $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . La muestra se colocó en desecador hasta que se enfrió y se pesó con precisión de 0.1mg. La cantidad de lignina se obtuvo por diferencia de pesos (Figura 4). El experimento se realizó por triplicado. El porcentaje de lignina se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Lignina} = \frac{\text{Peso de lignina (g)}}{\text{Peso de la muestra anhidra libre de extraíbles (g)}} \times 100$$

#### 4.3.3. DETERMINACIÓN DE CELULOSA

La determinación de celulosa se realizó por el método de Kurschner y Hoffer descrito por Cárdenas, Gómez y Padilla (2009). Se tomó 1 g de materia libre de extraíbles y se colocó en un matraz bola. En un vaso de precipitación de 100 ml se preparó una solución colocando 20 ml de etanol al 95% y 5 ml de ácido nítrico concentrado. La solución se vertió con cuidado dentro del balón con la muestra y se hirvió a baño María a reflujo durante 30 minutos y se decantó. El líquido se pasó por un filtro Gooch de porosidad fina y peso conocido, cuidando de que la muestra siga dentro del balón. El sólido se sometió a una segunda digestión por 30 minutos con 25 ml de la solución etanol-ácido nítrico. Se eliminó nuevamente el líquido y se realizó una tercera digestión con 100 ml de agua destilada por una hora.

El contenido total de balón fue filtrado en el Gooch, la muestra se lavó con agua destilada caliente, después con 75 ml de solución saturada de acetato de sodio y por último con 300 ml de agua destilada caliente. El residuo fue secado en estufa a  $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , colocado en desecador hasta que se enfrió y se pesó con precisión de 0.1 mg. La cantidad de celulosa se obtuvo por diferencia de pesos (Figura 5). El experimento se realizó por triplicado. El porcentaje de celulosa se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Celulosa} = \frac{\text{Peso de celulosa (g)}}{\text{Peso de la muestra anhidra libre de extraíbles (g)}} \times 100$$

#### 4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo para la tasa de crecimiento miceliar (mm/día). Para cada cepa independientemente se aplicó el análisis y prueba estadística especificada en la tabla 3, correspondiente a la naturaleza del conjunto de datos. Esto se llevó a cabo únicamente para las cepas del grupo 1 y 2. En el caso de las cepas del grupo 3 y 4 se trabajó únicamente con los datos descriptivos.

Se realizó un análisis Factorial 2x2 en DCA para cada una de las cepas en forma independiente para determinar si existían diferencias significativas entre la tasa de crecimiento miceliar (mm/día) después de haber sido almacenadas a las diferentes temperaturas y meses. Este análisis paramétrico fue aplicado para el conjunto de datos de cada cepa que cumplieran con el requisito de normalidad. Para este análisis se calculó el Coeficiente de variación (CV), en los casos en los que se obtuvo un CV mayor al 20% y no hubo una distribución normal, se hizo una transformación logarítmica de datos. Para las cepas a las que se aplicó la transformación logarítmica de datos y que se mantuvieron sin distribución normal o con CV mayor al 20% se realizaron pruebas No paramétricas. Las pruebas usadas fueron Kruskal-Wallis y Mann-Whitney.



## **5. RESULTADOS**

### **5.1. VIABILIDAD Y PUREZA**

En el presente estudio cepas de hongos basidiomicetes fueron almacenadas por un método a corto plazo bajo refrigeración a temperatura de 4°C y por un método de largo plazo a temperatura de -80°C en ultracongeladora, teniendo en común la metodología de preparación del sustrato a inocular con los hongos, en este caso granos de maíz. A cada uno de los tubos y crioviales guardados se hará referencia como copias.

#### **5.1.1. ALMACENAMIENTO EN MAÍZ A 4°C Y -80°C POR 2, 5 Y 10 MESES**

Los resultados de viabilidad y pureza de las cepas almacenadas a 4°C y -80°C por el tiempo de 2, 5 y 10 meses se muestran en la tabla 4 para el grupo 1 y para el grupo 2 en la tabla 5.

La viabilidad evaluada para las cepas almacenadas a 4°C dio como resultado que de las 18 cepas probadas 17 sobrevivieron a por lo menos uno de los dos meses a los que se mantuvieron guardadas, excepto por la cepa M1 la cual fue probada únicamente para el tiempo de 10 meses. De un total de 57 copias que se mantuvieron almacenadas a 4°C, sin distinción de cepa o tiempo, y fueron sacadas de la refrigeración para probar su viabilidad, 15 murieron lo que equivale a un 74% de éxito en el almacenamiento a 4°C.

De las cepas que no mostraron crecimiento en las primeras copias probadas, se tomó otra copia del mismo tiempo de almacenamiento para verificar si en realidad la cepa murió, en algunos casos en el segundo o tercer intento la cepa mostro viabilidad positiva, como fue el caso de la cepa K17 de 10 y 2 meses, N9 de 5 y 2 meses, y R22 de 2 meses, mientras que las cepas que definitivamente no presentaron crecimiento en ninguno de los intentos dentro del mismo mes fueron la R22 de 5 meses, la L18 y S21 de 2 meses, y la M1 de 10 meses.

En el caso de las 17 cepas almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  todas mostraron viabilidad positiva, incluyendo a la cepa M1, que murió a  $4^{\circ}\text{C}$ . De un total de 65 copias almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , sin distinción de cepa o tiempo, las que fueron retiradas de la ultracongeladora, solo dos no crecieron, la cepa S21 de 2 meses y G11 de 5 meses, de estas cepas se hizo otro intento y en los dos casos hubo crecimiento. El éxito para el almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$  es de 97%.

En cuanto a la pureza de los cultivos que fueron sacados de refrigeración a  $4^{\circ}\text{C}$ , 4 de las 18 cepas presentaron contaminaciones, las cepas K17 y G11 de 2 meses, C5 de 10 meses y H8 de 2 y 5 meses. Nueve de las 57 copias presentaron contaminación en al menos uno de los inóculos tomados de los tubos de ensayo. El porcentaje de contaminación en las cepas almacenadas a  $4^{\circ}\text{C}$  fue de 16%.

En las cepas almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  se presentó contaminación en seis de las 17 cepas probadas. En las cepas K17, H8 y G11 de 2 meses, B4 de 10 meses, L18 y C5 de 2 y 10 meses. Once de 65 copias retiradas de la ultracongeladora presentaron contaminación en al menos uno de los inóculos tomados a partir de los crioviales. Cepas almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  presentaron 17% de contaminación.

### **5.1.2. ALMACENAMIENTO A $4^{\circ}\text{C}$ POR 10 Y 12 MESES EN MAÍZ Y CEBADA**

Este análisis pretende comparar el almacenamiento de las cepas de basidiomicetes en dos diferentes sustratos, maíz y cebada, usando la misma metodología de preparación antes de ser inoculados con los hongos a ser almacenados. Los resultados de viabilidad y pureza de las cepas almacenadas a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 meses (grupo 3) y 12 meses (grupo 4) en maíz y cebada se muestran en la tabla 6.

En este análisis se usaron 8 cepas en total, 6 almacenadas por 10 meses y 2 cepas por 12 meses. En el caso de las cepas almacenadas en maíz todas las cepas mostraron viabilidad positiva, mientras que para las cepas almacenadas en cebada solamente la cepa A3 no presento

crecimiento. De las 8 cepas comparadas en este análisis, en el caso del maíz de 11 copias en total que se retiraron del almacenamiento a 4°C, 2 murieron, estas corresponden a la cepa K17 de 12 meses; mientras que para la cebada solamente una copia correspondiente a A3 de 10 meses, no sobrevivió al almacenamiento, de un total de 8. Dando un 82% de éxito en el almacenamiento en maíz y 87.5% en cebada.

De las 8 cepas probadas, 2 copias correspondientes a cepas almacenadas en maíz evidenciaron contaminación en el cultivo, la cepa C5 de 10 meses, y la cepa L18 de 12 meses, mientras que en las cepas almacenadas en cebada no se encontró contaminación. Dando un porcentaje de contaminación en maíz de 18% y en cebada 0%.

## **5.2. ESTABILIDAD MORFOLÓGICA DEL CRECIMIENTO MICELIAR**

### **5.2.1. ALMACENAMIENTO EN MAÍZ A 4°C Y -80°C POR 2, 5 Y 10 MESES**

En el presente estudio se estimó la estabilidad morfológica de las cepas mediante el análisis de las características macroscópica del micelio y la tasa de crecimiento miceliar (mm/día).

#### **5.2.1.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL MICELIO**

En cuanto a la morfología del crecimiento miceliar, todas las cepas almacenadas a las dos diferentes temperaturas conservaron las características propias de cada especie (Figura 6, 7 y 8). Solamente en el caso de dos cepas se observaron alteraciones en el crecimiento normal. Estas fueron cepas de dos meses de almacenamiento a 4°C, en el caso de la cepa A3 el crecimiento del micelio fue normal hasta las 48 horas y después se detuvo. Similar ocurrió en la cepa H8 la que creció solo hasta las 96 horas.

Además se evidenció un retraso en el crecimiento de ciertas cepas. La mayoría de las cepas presentaron crecimiento dentro de las primeras 72 horas después de la inoculación sobre

el agar nutritivo. Hubo casos en los que el crecimiento sobrepasó los tres días, las cepas que presentaron esta característica se muestran en la tabla 4 y 5.

En uno de los aislados de K17 de 10 meses a 4°C se encontró crecimiento después de seis días, mientras que otros no evidenciaron crecimiento; S21 de 10 y 2 meses a -80°C presentó en 3 casos crecimiento al 4 día. E7 de 10 meses a 4°C un caso creció a los 4 días. R22 de 10 meses de -80°C con 2 casos creció al día 4. N9 de 5 meses un caso creció al día 6 a 4°C, a -80°C a los 5 meses 2 casos crecieron a los 4 y 5 días, y a 2 meses 2 aislados crecieron al quinto y sexto día.

#### **5.2.1.2. TASA DE CRECIMIENTO MICELIAR**

La tasa de crecimiento miceliar (mm/día) para las cepas almacenadas en maíz a 4°C y -80°C se registran en la tabla 7 para las cepas del grupo 1 y en la tabla 8 para las cepas del grupo 2. Con la ayuda del análisis estadístico, se pudo detectar si existieron diferencias significativas entre las diferentes variables presentes en este análisis, como son en primer lugar la temperatura, a 4°C y -80°C, y el tiempo que permanecieron almacenadas, 2 y 10 meses en el caso de las cepas del grupo 1, y para las cepas del grupo 2 a los 2 y 5 meses.

Los resultados para las cepas del grupo 1 y 2 que fueron analizadas mediante métodos paramétricos se registran en la tabla 9. Mientras que para las cepas almacenadas por métodos no paramétricos, los resultados para las cepas del grupo 1 se registran en la tabla 10, y del grupo 2 en la tabla 11.

Para la cepa K17 los resultados para la interacción entre las variables temperatura y mes fue significativa. Se observaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento miceliar entre las temperaturas de almacenamiento, ya que el valor  $p$  de la temperatura fue menor a 0,05, entonces podemos decir que la tasa de crecimiento del hongo sí fue afectada por la temperatura de almacenamiento, siendo mayor a -80°C. En cuanto a los meses, el  $p$  fue mayor a 0,05 por lo que no hubo diferencias significativas, así a los diferentes meses de almacenamiento no se presentó un cambio en la tasa de crecimiento.

La cepa L18 presentó diferencias altamente significativas para la interacción entre las variables y la temperatura de almacenamiento. Se evidenció que la temperatura es un factor que determina el crecimiento miceliar en esta cepa. Los resultados obtenidos mostraron que la cepa murió a los 2 meses de almacenamiento a 4°C, y la tasa de crecimiento de la cepa después de 10 meses a esta misma temperatura fue menor que el crecimiento a -80°C. No hubo diferencias significativas entre los diferentes meses de almacenamiento.

La cepa S21 no presentó diferencias significativas en la tasa de crecimiento a las dos temperaturas de almacenamiento ni para la interacción de las variables. Pero si existió una diferencia significativa en el tiempo de almacenamiento, debido a que a los 2 meses a 4°C el hongo murió.

Para la cepa C5 se observaron diferencias significativas para la interacción, la temperatura y los meses. El valor p de la temperatura fue de 0.045, por lo que la diferencia en la tasa de crecimiento entre las dos temperaturas no fue muy pronunciada, lo que también se pudo evidenciar al comparar los promedios respectivos. En cuanto a la diferencia entre meses se observó un descenso en la tasa de crecimiento a medida que el tiempo de almacenamiento aumentó para las dos temperaturas de almacenamiento. A la temperatura de 4°C se presentó la mayor tasa de crecimiento comparando entre los mismos meses.

En los análisis estadísticos para la cepa E7 se obtuvo un valor p de 0.000 para la temperatura, lo que significa que existieron diferencias altamente significativas en la tasa de crecimiento miceliar entre las dos temperaturas de almacenamiento. Los promedios mostraron que la tasa de crecimiento miceliar fue mayor a la temperatura de -80°C. No hubo diferencias significativas para la interacción ni para los meses de almacenamiento.

La cepa I20 no presentó diferencias significativas para la temperatura, meses de almacenamiento ni su interacción, debido a que el valor p fue mayor a 0.005 en todos los casos. Aunque se observó diferencias entre los promedios de la tasa de crecimiento miceliar a las diferentes temperaturas y meses, estas no fueron estadísticamente significativas.

La cepa B4 mostró que existen diferencias significativas para la interacción de las variables y para la temperatura. Se pudo inferir que la temperatura influyó en la tasa de crecimiento miceliar, siendo esta mayor a 4°C. Las diferencias que se observaron entre los promedios a los diferentes meses no son significativas.

En los resultados de la cepa A3 se evidenció que no hubo diferencias significativas en la tasa de crecimiento miceliar entre las diferentes temperaturas ni para la interacción, mientras que entre meses de almacenamiento si existieron diferencias significativas.

La cepa M1 fue únicamente probada a los 10 meses de almacenamiento debido a que no se poseían copias de otros meses. Los datos estadísticos mostraron que existió una diferencia significativa en la tasa de crecimiento miceliar a los 4°C y -80°C debido a que la cepa no creció a 4°C, pero si a temperatura de almacenamiento de -80°C. De esta cepa a lo largo de un año se realizaron varios intentos fallidos para poder multiplicarla a partir de tubos almacenados a 4°C, pero la cepa no sobrevivió a esta temperatura, únicamente al almacenamiento en ultracongeladora.

Para la cepa H8 no se observaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento a las dos temperaturas, en el tiempo de almacenamiento ni en su interacción.

En el análisis estadístico de la cepa J16 se encontró que hay diferencias altamente significativas en el tiempo de almacenamiento y en su interacción con la temperatura. Observando los promedios de la tasa de crecimiento se puede ver que esta diferencia se presentó en el almacenamiento a 2 y 5 meses para la temperatura de 4°C. Hubo una tasa de crecimiento menor a los 2 meses, aproximadamente la mitad del crecimiento a los 5 meses. No se encontró diferencias entre el almacenamiento a 4°C y -80°C.

En la cepa R22 se encontró diferencias significativas para la variable temperatura y la interacción. Al observar los promedios de la tasa de crecimiento fue notable la diferencia, ya que para los aislados de 4°C a 2 meses de almacenamiento se vio que el crecimiento es mínimo en comparación con lo provenientes de -80°C, mientras que a 5 meses la cepa no

presentó crecimiento. No se encontró diferencias significativas en el tiempo de almacenamiento.

Para la cepa N9 se encontró únicamente diferencias significativas en la tasa de crecimiento miceliar entre las temperaturas de 4°C y -80°C al tiempo de 2 meses observándose un crecimiento mayor a -80°C. No hay diferencias significativas en general para la temperatura comparando los dos meses, ni entre meses, ni para la interacción.

En la cepa P14 se encontró diferencias estadísticamente significativas únicamente para los meses, el tiempo de almacenamiento influyó en las tasa de crecimiento miceliar. Se puede ver en la tabla 9 de los promedios que a medida que el tiempo aumenta el crecimiento disminuye. Mientras que la temperatura no afectó al crecimiento miceliar.

La cepa G11 mostró únicamente diferencias significativas en la tasa de crecimiento miceliar entre los meses dentro de la temperatura de -80°C. Las diferencias que se observaron en los promedio entre temperaturas y meses a 4°C no fueron significativas, sino que se debieron al azar o por errores de muestreo.

En el caso de la cepa F10, se observó diferencias significativas para la interacción de las variables mas no se presentó diferencias significativas en la tasa de crecimiento miceliar para la temperatura ni para los meses. Algo similar ocurrió con la cepa O13 en la que tampoco se encontró diferencias significativas para la temperatura, meses de almacenamiento ni su interacción.

En las cepas que se observó un mayor crecimiento a la temperatura de almacenamiento de -80°C fue para la cepa K17, L18, E7 y R22, mientras que para las cepas C5 y B4 se observó un mayor crecimiento a la temperatura de 4°C. Para el resto de cepas no hubo diferencias estadísticamente significativas.

En cuanto a si existen diferencias en la tasa de crecimiento miceliar entre los diferentes meses de almacenamiento, fue significativo para las cepas S21, C5, A3, P14 y G11.

En la cepa S21 a los 2 meses de almacenamiento a 4°C no hubo crecimiento del micelio. En la cepa C5 y P14 se vio que a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento disminuyó el crecimiento miceliar a las 2 temperaturas, similar para la cepa A3 a 4°C. En la cepa G11 en cambio se ve un efecto inverso, presentándose menor crecimiento a los 2 meses en comparación con los 5 meses de almacenamiento a la -80°C.

## **5.2.2 ALMACENAMIENTO A 4°C POR 10 Y 12 MESES EN MAÍZ Y CEBADA**

### **5.2.2.1 CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DEL MICELIO**

En los análisis de la morfología del crecimiento miceliar, después del almacenamiento a 4°C por 10 y 12 meses en granos de maíz y cebada las cepas conservaron las características propias de cada especie. Solamente en el caso de la cepa L18 en la que se trabajó con los datos que presentaron contaminación debido a que no se poseía más copias de esta fecha, no se evidenció un crecimiento normal.

En un solo caso de la cepa E7 almacenada en maíz se observó que el crecimiento miceliar se presentó al cuarto día de incubación, para todos los demás aislados el crecimiento estuvo dentro de las primeras 72 horas de inoculación.

### **5.2.2.2 . TASA DE CRECIMIENTO MICELIAR**

La tasa de crecimiento miceliar (mm/día) para las cepas almacenadas a 4°C por 10 y 12 meses en granos de maíz y cebada se registran en la tabla 12. Para este análisis no se usó métodos estadísticos debido a que el tamaño de muestras fue menor al requerido para realizar un ANOVA. Las diferencias presentes en la tasa de crecimiento miceliar (mm/día) después del almacenamiento usando como sustrato maíz y cebada, se analizaron mediante los resultados descriptivos.



En la tabla 13 se presentan el promedio de la tasa de crecimiento miceliar para las cepas del grupo 3 y 4. Se puede observar que para las cepas A3, B4, C5, I20 y K17 el promedio del crecimiento miceliar es mayor en granos de maíz que en cebada. El resto de cepas D4, E7 y L18 presentó mayor crecimiento en granos de cebada que en maíz. En las cepas E7 y L18 la diferencia fue mucho más marcada. En el caso de la cepa L18 el menor crecimiento en granos de maíz pudo deberse a que hubo contaminación, lo que no dejó que el hongo se desarrolle normalmente en la caja Petri.

### **5.3 CONTENIDO DE LIGNINA Y CELULOSA EN GRANOS DE MAÍZ Y CEBADA**

Los resultados de los análisis químicos para determinar el porcentaje de lignina y celulosa presentes en los granos de maíz y cebada se presentan en la tabla 13. Se pudo observar que hubo diferencias en el contenido de lignina entre los dos granos. Para la cebada el contenido fue de 6.41%, mientras que en el maíz fue de 0.48%. En el caso del contenido de celulosa en los granos fue de 7.70% en la cebada y en el maíz de 5.38%.

## 6. DISCUSIÓN

La metodología analizada en este estudio para la preservación de cultivos miceliares de hongos basidiomicetes, en base al almacenamiento en granos de maíz y cebada, puede considerarse exitosa, ya que los resultados obtenidos muestran que se cumplió con las tres condiciones para conservar cultivos celulares correctamente: 1) que el cultivo sea puro, evitando contaminaciones durante el proceso de conservación, 2) viabilidad celular del 70-80% durante el tiempo de conservación, y 3) estabilidad genética de las células (García y Uruburu, 1991), estimada en base a la morfología y tasa de crecimiento miceliar (mm/día).

La metodología permitió en su mayoría obtener cultivos puros, hubo pocos casos en los que se presentó contaminación, esto corresponde básicamente a que hubo algún cambio originado por el método de preservación (García y Uruburu, 1991). En los casos en los que se presentó contaminación a las dos temperaturas de almacenamiento para el mismo mes, se puede inferir que hubo un mal manejo de las técnicas usadas para la inoculación, o que la caja de Petri desde la que se tomó el micelio presentó alguna contaminación que no fue identificada a tiempo. Sin embargo, el porcentaje de contaminación para las cepas almacenadas en maíz a 4°C y -80°C fue bajo, siendo del 16% y 17%, respectivamente. Algo similar ocurrió con las cepas del grupo 3 almacenadas en maíz a 4°C, con un porcentaje de contaminación de 18% y las cepas del grupo 4 en cebada a 4°C que no presentaron contaminación.

Con la metodología analizada se obtuvo un porcentaje de viabilidad superior al 70%, entre el 74% y 97%, para el almacenamiento a 4°C y -80°C en maíz, respectivamente. Igualmente, para el almacenamiento en granos de maíz y cebada a 4°C, se obtuvo un éxito del 82% y 87.5%, respectivamente. De todas las cepas se pudo recuperar cultivos viables después del almacenamiento, ya sea por una u otra temperatura, o a uno de los dos meses de almacenamiento, o por uno de los dos tipos de grano.

Para establecer una colección de cultivos se recomienda mantener las cepas guardadas por al menos dos métodos diferentes (García y Uruburu, 1991; Nakesone et al, 2011).

La estabilidad morfológica pareció mantenerse en la mayoría de los aislados. Se observó que no hubo cambios en las características propias de cada especie después de la preservación a las diferentes temperaturas y granos usados como sustrato; fenotipos conservados sugiere que no hubo cambios genéticos (Croan et al., 1999), así como cambios en la morfología del micelio u otros caracteres indican que hubo mutación (Malik, 1992). Hubo dos casos en los que se pudo apreciar un cambio en el crecimiento normal del hongo, en el almacenamiento a 4°C en granos de maíz para las cepas A3 y H8, en las que el crecimiento se detuvo después de unos días.

Se determinó un retraso prolongado en el inicio del crecimiento de varias cepas principalmente en la cepa K17 almacenada a 4°C y N9 almacenada a -80°C. Esto es similar al periodo de latencia, en el que los microorganismos pasan por un periodo de transición cuando son transferidos a una nueva condición. En este periodo se producen las enzimas necesarias para que ellos puedan crecer en un nuevo medio ambiente, se presenta una gran actividad metabólica, donde no hay incremento de células, pero hay aumento individual en el tamaño, contenido proteico y ADN de las células. La duración de este periodo depende del estado fisiológico de las células inoculadas y del ambiente (Hernández, Alfaro y Arrieta, 2003). Por lo que se piensa que este retraso en el inicio del crecimiento puede estar relacionado a que hubo un deterioro en el estado fisiológico de estas cepas.

En el caso del almacenamiento en maíz a la temperatura de 4°C hubo casos en los que no se conservaron algunas cepas silvestres provenientes de clima tropical (K17, L18, S21 y R22), mientras que algunas cepas comerciales tropicales (H8, J16, O13 y B4) se conservaron sin problema, a excepción de la cepa M1. Las cepas comerciales de clima temperado (P14, C5, G11 y A3) y temperado-tropical (D4, E7, F10 E I20) no presentaron problema en la viabilidad, con excepción de la cepa N9. En el caso del almacenamiento en cebada solo la cepa comercial tropical A3 no sobrevivió.

Esta diferencia probablemente corresponda a que las cepas comerciales cumplen una serie de características por las que fueron escogidas para ser comercializadas o han pasado por un proceso de domesticación en el cual se seleccionaron algunas características (Stamets, 2000; Oei, 2016), entre estas, la capacidad de ser almacenadas a bajas temperaturas y permanecer viables a través del tiempo. Esta adaptación es un proceso que se da a lo largo del tiempo con selección de caracteres deseados en el transcurso de varias generaciones o por la formación de híbridos (Pacheco, Palacios y Vásquez, 1998; Oei, 2016).

Sin embargo, cepas que han sido recientemente aisladas de su ambiente natural tienen que adaptarse a nuevas condiciones de crecimiento. Estas cepas almacenadas a 4°C no detienen por completo sus procesos fisiológicos y metabólicos, por lo que en algún punto murieron mientras estuvieron congeladas o en el momento de la refrigeración por cambios bruscos de temperatura (García y Uruburu, 1991).

Las diferencias entre cepas de climas templados y tropicales son las condiciones ambientales, principalmente la temperatura, a las que están expuestas para vivir y desarrollar su ciclo normal (Pacheco et al., 1998). En las regiones de clima tropical las variaciones de temperatura son mínimas, y no se presentan estaciones marcadas, mientras que las regiones templadas presentan a lo largo del año variaciones fuertes de temperatura, marcando diferentes estaciones. Los organismos de climas templados han desarrollado estrategias que les permiten soportar estos cambios de temperatura, mediante adaptaciones fisiológicas y genéticas. En hongos los mecanismos de sobrevivencia no han sido aún comprendidos (Hoshino, Terami, Tkachenko, Tojo y Matsumoto, 2010). Las cepas provenientes de regiones templadas por estar expuestas naturalmente a cambios de temperatura, posiblemente las hace más aptas para soportar el proceso de preservación.

En el caso de las excepciones de las cepas comerciales, en las que no hubo crecimiento y se reportó cambios morfológicos o periodos prolongados de crecimiento, en las cepas templadas N9 y A3, y la cepa tropical M1 en las que también se registró la muerte a 4°C, es posible que estos eventos estén relacionados con la edad de la cepa. Los hongos almacenados vendrían ya de múltiples generaciones, por lo que posiblemente perdieron vigor,

esto puede deberse a que como el hongo ha sido varias veces clonado y no ha tenido una recombinación o diversidad genética, las cepas han envejecido y perdido sus características (Oei, 2016). En la conservación de cultivos es fundamental preservar cepas que se mantengan lo más cercano a sus orígenes genéticos, por lo que es importante que al almacenar una cepa esta tenga el menor número de generaciones posibles (Stamets, 2000).

Estudios realizados reportan que las cepas de basidiomicetes tropicales presentan dificultades tanto en la preservación a largo y corto plazo, en comparación con cepas templadas, siendo la exposición a bajas temperaturas una de las determinantes para la supervivencia de estos hongos. En este estudio al usar una metodología con granos de maíz y cebada se han observado mejores resultados que los reportados para cepas almacenadas en agar con o sin agua destilada a bajas temperaturas (Croan et al., 2000).

De los cultivos de estos hongos que han sido almacenados en agar a la temperatura de 8-10°C el 50% sobrevivió después de 6 meses, los que se guardaron a 4°C con agua destilada estéril el 57% sobrevivió, almacenados con agua estéril a 16°C por 10 meses presentaron 92% de viabilidad y de estos aislados sin agua destilada sobrevivieron el 42%. Estos aislados conservados en agua a 4°C y 15°C mostraron periodos prolongados de latencia con un mínimo crecimiento (Croan et al., 2000).

Wasser et al. (2002) y Kerrigan (2005) reportan dificultades para preservar cepas viables del hongo tropical *Agricus blazei* después de la refrigeración a estas temperaturas. Pero el hongo al ser almacenado en granos de arroz a -80°C con 10% de glicerol tuvo buenos resultados, siendo este el mejor método para conservarlo (Barros, Ferreira y Linde, 2011).

Los granos muestran ser una opción eficaz para la preservación del micelio, el almacenamiento en este sustrato ha mostrado una resistencia ante los efectos ambientales (Barros et al., 2011). Varios estudios que han usado granos para la preservación del micelio han reportado resultados favorables, se han usado granos de avena para almacenamiento a -70°C (Mantovani et al., 2008) y granos de sorgo a -196 ° C (Mata y Pérez-Merlo, 2003) para crioconservación del género *Pleurotus*.

Se ha reportado que la criopreservación de cepas de hongos tuvo mejores resultados al ser estas almacenadas en granos que en un medio con agar solamente (Wang, Lin y Jong, 1990). Singh, Upadhyay, Yadav y Tiwari (2004) tuvieron resultados en los cuales múltiples aislados de hongos preservados en granos fueron genéticamente más estables que al ser almacenados en discos miceliares de un medio sintético durante la criopreservación. Los granos usados como sustrato permiten una mejor supervivencia del hongo probablemente por la protección física que brindan al suave y delicado micelio oculto dentro del grano evitando las lesiones causadas por las bajas temperaturas, o la innata cualidad del grano que permite una mejor colonización a los hongos y de esta manera una mejor supervivencia (Singh et al., 2004; Veera y Meera, 2010; Montavani et al, 2012).

El uso de granos ha mostrado también resultados positivos al ser estos almacenados bajo refrigeración. Cepas comerciales de basidiomicetes tropicales fueron viables después del almacenamiento en granos de sorgo a temperaturas de 5-8°C, sin cambios en las características del micelio. Efectos positivos se obtuvieron en especial para cepas de *Ganoderma*, las cuales presentan dificultad para ser almacenadas de forma estable (Veena y Meera, 2010), lo que también se corroboró en este estudio en el que las cepas comerciales de *Ganoderma* se mantuvieron viables.

Hubo casos en que las cepas murieron al ser almacenadas a 4°C pero si sobrevivieron después del almacenamiento a -80°C. El almacenamiento en ultracongeladora resulta ser en mayor parte el método más estable ya que permitió conservar las características morfológicas estables de los hongos y su supervivencia después del almacenamiento. Las cepas, sean estas de clima temperado o tropical, comerciales o nativas, permanecieron viables. Esta diferencia con el almacenamiento a 4°C se da porque a temperaturas por encima de -80°C se pueden producir ligeras actividades bioquímicas y metabólicas (Barros et al., 2011) mientras que el almacenamiento a -80°C es un método de almacenamiento a largo plazo, en el cual el crecimiento se detiene, pero el hongo sigue vivo (García y Uruburu, 1991).

Esto también es corroborado por los análisis estadísticos realizados para los resultados de la tasa de crecimiento miceliar para las cepas del grupo 1 y 2, en las cuales se

encontró diferencias significativas en las cepas K17, L18, R22 y E7, los que presentaron mayor crecimiento miceliar (mm/día) a las temperaturas de almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Hubo casos especiales en las cepas C5 y B4 en las que el crecimiento miceliar fue mayor a los  $4^{\circ}\text{C}$  de almacenamiento, siendo esta diferencia significativa. Un hecho interesante fue que se detectó diferencias significativas en la tasa de crecimiento entre meses de almacenamiento, donde las cepas C5, P14 y A3 a  $4^{\circ}\text{C}$  presentaron que a mayor tiempo de almacenamiento disminuyó la tasa de crecimiento miceliar. Esto corresponde a que a la temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  el hongo sigue activo y al no poseer una fuente renovada de alimento mientras pasa el tiempo el hongo pierde vitalidad y sufre una degeneración celular (Chang y Miles, 2004).

En el almacenamiento por congelación se emplean crioprotectores los cuales protegen a las células en el momento de la congelación (García y Uruburu, 1991). En nuestra metodología no se usó ningún crioprotector para la conservación a  $-80^{\circ}\text{C}$ , no parece ser este indispensable ya que los aislados pudieron conservar su viabilidad. La página del ATCC (2011) reporta que algunas cepas almacenadas por congelación pueden ser cultivadas en semillas estériles o granos de polen sin la necesidad de usar un crioprotector. Esto permite facilitar el proceso de almacenamiento al evitarse este proceso laborioso, que muchas veces no resulta ser efectivo.

En cuanto a las diferencias observadas en los promedios de la tasa de crecimiento en las cepas del grupo 3 y 4 almacenadas a  $4^{\circ}\text{C}$  en los dos diferentes granos usados para su almacenamiento, se observó que las cepas A3, B4, C5, I20 y K17 presentan mayor crecimiento en granos de maíz, mientras que las cepas D4 y E7 en cebada. La cepa L18 presenta mayor crecimiento en cebada, pero estos datos pueden estar bajo la influencia de que esta cepa presentó contaminación en los granos de maíz y se trabajó con esos datos al no poseer más copias almacenadas, por lo que el crecimiento normal se vio afectado por la interacción con otros organismos (Stamets, 2000).

Aunque en maíz se haya reportado que la mayoría de cepas estudiadas presentaron mayor tasa de crecimiento miceliar que en cebada, los porcentajes de viabilidad y pureza fueron mejores para cepas almacenadas en cebada. Este hecho no quiere decir que en cebada

se conservan mejor ya que si hubo muerte micelial en maíz se explica por las razones antes expuestas propias de cada tipo de cepa, y en cuanto a la contaminación se puede evitar mejorando las técnicas de inoculación. Por lo que se cree que el mejor sustrato sería el maíz.

Se realizaron análisis químicos con los que se buscó dar una explicación a la diferencia de crecimiento micelial de las cepas en los diferentes granos. Se determinó la cantidad de material lignocelulósicos presente en ambos granos, ya que estas cepas al ser saprofitos pertenecientes al grupo de hongos de la pudrición blanca degradan estos materiales como parte de su alimentación (Adaskaveg et al., 1990; Stamets, 2000; Finkelstein y Ball, 2003).

En los resultados encontrados se determinó que la cebada posee mayor cantidad de lignina (6.41%) y celulosa (7.7%), mientras que el maíz presenta menores cantidades de lignina (0.48%) y celulosa (5.38%). Kirk y Farrell (1987) sugieren que los hongos no utilizan la lignina como fuente de carbono, sino que evolutivamente preservaron la habilidad de degradar la lignina para poder tener acceso a la celulosa de la cual sí se alimentan. Cinco de siete cepas presentan mayor crecimiento en maíz por lo que parece ser este el sustrato más apto para el crecimiento de estos hongos. Probablemente en maíz los hongos crecieron mejor ya que la celulosa se encontraba en mayor disponibilidad para ser utilizada sin que el hongo tenga que gastar energía en degradar primero la lignina.

Además los hongos posiblemente no se estén alimentando principalmente de la celulosa, sino de otros compuestos de menor peso molecular, también presentes en las células vegetales, como son los azúcares simples, entre ellos: glucosa, sacarosa y fructosa, presentes en los granos (Food and Agriculture Organization of United Nations, 1993; Pinzón, 2004). Los azúcares simples en conjunto con el nitrógeno proveniente de las proteínas, inician el proceso de nutrición y promueven la secreción de enzimas lignocelulósicas (Alananbeh, Bouguellah y Al Kaff, 2014). Estos compuestos son los primeros en ser absorbidos directamente por las células fúngicas, a diferencia de los compuestos lignocelulósicos los que primero necesitan ser degradados por enzimas a compuestos más simples (Lemaire, 1996; Finkelstein y Ball, 2003; Rodríguez, 2015).



La proteína presente en 10.3% para granos de maíz y en 12.7% en granos de cebada, los azúcares simples en 1-3% y compuestos lignocelulósicos presentes en mayor cantidad en el pericarpio de los granos que representa apenas el 5-6% del total del grano, son cantidades mínimas en comparación con el contenido de almidón. En los granos de maíz y cebada el almidón está presente en cantidades aproximadas del 76% y 64%, respectivamente (FAO, 1993; Gibb, 2000).

Hou, Zhou, Wang, Du y Yan (2004) investigaron la optimización de la fuente de carbono para mejorar la producción de lacasa en *Pleurotus ostreatus*, encontraron que el hongo es capaz de asimilar diferentes polímeros como celulosa, celobiosa, glucosa, glicerol y almidón, siendo el compuesto que da la mayor producción de la enzima la celobiosa y de menor producción el almidón. Al contrario, Moreno y Opina (2008) tuvieron resultados en que hubo mayor producción de enzimas lignocelulósicas cuando en el medio también se encontraba almidón abundantemente. Esta afinidad se explica debido a que el almidón es más fácil de degradar en comparación con la celulosa, y debido a que el hongo expresó enzimas tipo glicosil hidrolasas para degradar almidón (Choteborska, Palmaro, Galbe, Melzohc y Rychtera, 2004; Moreno y Opina, 2008).

En el presente estudio los hongos probablemente estén usando como fuente de carbono los azúcares simples, la proteína, y principalmente la celulosa y el almidón, el cual es abundante, en ambos granos. En maíz el porcentaje de almidón es mayor comparado con la cebada y es probable que por esta razón y por la mayor cantidad de celulosa disponible para ser consumida por el hongo, 5 de las cepas 7 cepas hayan crecido mejor en este sustrato. Sin embargo, el hecho de que 2 de 7 cepas crecieron mejor en cebada abre la discusión sobre diferencias metabólicas entre cepas y que justifican la necesidad de continuar con este tipo de estudios experimentales probablemente para cada cepa que se quiera preservar.

## 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Existen diversos métodos para preservar una colección de cultivos miceliares, la elección de estos dependerá principalmente de los recursos con los que se dispongan y también del objetivo con el que se está preservando una cepa. Si es el caso de investigación a nivel biotecnológico se requiere que el método aplicado permita que las características genotípicas, fenotípicas y fisiológicas se mantengan sin cambios durante el periodo de almacenamiento.

La metodología analizada en base al almacenamiento en granos de maíz y cebada se mostró eficiente, permitiendo preservar cepas viables de basidiomicetes comerciales y nativos de climas tropicales y templados.

En el caso de nuestro laboratorio los dos métodos de preservación a las dos diferentes temperaturas son necesarios, ya que estos se complementan para mantener la mayor estabilidad genética posible para los estudios enfocados en la búsqueda de moléculas potencialmente activas.

Dependiendo de la característica de la cepa se puede almacenar o no en una de las dos temperaturas. Cepas con aislados originales de hongos nativos, o que sean cepas que ya han tenido múltiples generaciones o presenten degeneración celular es mejor conservarlas a temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , ya que a esta temperatura es más probable que se mantengan viables.

Para comprender como el hongo se alimenta de los sustratos usados para el almacenamiento miceliar y encontrar cuál sería el mejor, se necesita realizar un estudio más amplio enfocado en este tema.

En el proceso del almacenamiento de las cepas se debe trabajar con la mayor rigurosidad en cuanto a las condiciones y procesos de asepsia, así reducir el riesgo de contaminación y poder lograr un 100% de pureza en los cultivos miceliares.

Las metodologías son especie específica, pudiendo adaptarse y probarse para nuevas cepas de diferentes géneros de hongos.

## 8. LITERATURA CITADA

- Adaskaveg J. E., R. L. Gilbertson y R. A. Blanchette. (1990). Comparative studies of delignification caused by *Ganoderma* sp., *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6): 1932- 1943. doi: 0099-2240/90/061932-12\$02.00/0
- Alananbeh, K., Bouguellah, N. y Al Kaff, N. (2014). Cultivation of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* on date-palm leaves mixed with other agro-wastes in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biology Sciences*, 21 (6), 616-625. doi: 10.1016/j.sjbs.2014.08.001
- ATCC, American Type Culture Collection. (2011). Preservation and recovery of filamentous fungi Recuperado de <https://www.atcc.org/~media/PDFs/Technical%20Bulletins/tb02.ashx>
- Barroso, M. (2010). Pretratamiento de biomasa celulósica para la obtención de etanol en el marco de una biorrefinería (Tesis de Ingeniería). Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, España.
- Barros, N., Ferreira, A. y Linde, G. (2011). Cryopreservations at -80°C of *Agaricus blazei* on rice grains. *Microbiology Biotechnology*, 27, 3015–3018. doi: 0.1007/s11274-011-0772-9
- Berrin, J., Navarro, D., Couturier, M., Olivé, C., Grisel, S., Haon, M., Taussac, S., Lechat, C., Courtecuisse, R., Favel, A., Coutinho, P., y Lesage-Meessen, L. (2012). Exploring the natural fungal biodiversity of tropical and temperate forest toward improvement of biomass conversion. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (18), 6483–6490. doi: 10.1128/AEM.01651-12
- Bisen P., Baghel R., Sanodiya B., Thakur G., Prasad G. (2010). *Lentinus edodes*: A macrofungus with pharmacological activities. *Current Medicinal Chemistry*, 17(22), 2419–2430. doi: 10.2174/092986710791698495
- Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 Million species? *American Journal of Botany*, 98, 426–438. Recuperado de <http://cals.arizona.edu/classes/plp427L/Blackwell5MillionFungal%20Species2011.pdf>
- Cárdenas, V., Gómez, M. y Padilla, L. (2009). Degradación de celulosa y producción de etanol a partir del aserrín de guadua utilizando el sistema biológico (*Aspergillus niger* y *Saccharomyces cerevisiae*) (Tesis de pregrado en Química). Universidad del Quindío, Armenia, Colombia.
- Cheng, J. (2010). Biological Process for Etanol Production. En J. Cheng. (Eds.). *Biomass to Renewable Energy Processes* (209-272).CRC Press Taylor.

- Chang, S. y Miles, G. (2004). *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=EQjNBQAAQBAJ&oi=fnd&pg=P1&dq=chang+y+miles+2004+mushrooms+cultivation,+nutritional+value,+medicinal+effect+and+environmental+impact&ots=fbVM5Qf3j4&sig=RLTA8EtvSApaoTetmzhruLnJ63Y#v=onepage&q=chang%20y%20miles%202004%20mushrooms%20cultivation%2C%20nutritional%20value%2C%20medicinal%20effect%20and%20environmental%20impact&f=false>
- Choteborska, P., Palmaro, A., Galbe, M., Melzohck, K. y Rychtera, M. (2004). Processing of wheat bran to sugar solution. *Journal of Food Engineering*, 61, 561-565. Recuperado de [http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00216-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00216-4)
- Croan, S., Burdsall, H. y Rentmeester, R. (1999). Preservation of tropical Wood-inhabiting basidiomycetes. *Mycologia*, 91(5), 908-916. doi: 10.2307/3761546
- Cuervo, L., Folch, J. y Quiroz, R. (2009). Lignocelulosa como fuente de azúcares para la producción de etanol. *Bio-Tecnología*, 13, 11-20.
- DaSilva, E., Ratledge, C. y Sasson, A. (1992). *Biotechnology: Economic and Social Aspects: Issues for Developing Countries*. Recuperado de [https://books.google.es/books?id=dQUYmNUTrgkC&dq=preservation+mushrooms+in+barley&lr=&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.es/books?id=dQUYmNUTrgkC&dq=preservation+mushrooms+in+barley&lr=&hl=es&source=gbs_navlinks_s)
- Finkelstein, D. y Ball, C. (Eds). (2013). *Biotechnology of filamentous fungi: Technology and Products*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=zFfgBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Biotechnology+of+filamentous+fungi:+technology+and+products,+2013&ots=04aIX0GvAr&sig=uK7jYVqdZdfxMXzdxogqOtEJDUs#v=onepage&q=Biotechnology%20of%20filamentous%20fungi%3A%20technology%20and%20products%2C%202013&f=false>
- Food and Agriculture Organization of United Nations. (1993). El maíz en la nutrición humana. Recuperado de <http://www.fao.org/docrep/t0395s/T0395S00.htm#Contents>
- García, M. y Uruburu, F. (1991). La conservación de cepas microbianas. *Temas de actualidad*, 30, 12-16. Recuperado de [https://www.sem microbiologia.org/pdf/actualidad/SEM30\\_12.pdf](https://www.sem microbiologia.org/pdf/actualidad/SEM30_12.pdf)
- Gibb, D. (2000). Nutrition and Management: Characteristics of Common Feed Grains of Alberta Feed lot Management Guide. Recuperado de [http://www1.agric.gov.ab.ca/\\$department/deptdocs.nsf/all/beef11489](http://www1.agric.gov.ab.ca/$department/deptdocs.nsf/all/beef11489)
- Gunde-Cimerman N., Plemenitaš A. (2001). Hypocholesterolemic activity of the genus *Pleurotus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (Agaricales s. I., Basidiomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 3(4), 395-397.

- Guzmán, M., Zúñiga, N., Santafé, G. G., Torres, O., y Angulo, A. (2009). Actividad antioxidante y estudio químico del hongo *Pleurotus djamor* recolectado en córdoba. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 7(2), 63-69. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v7n2/v7n2a09.pdf>
- Hatakka, A. (1994). Lignin-modifying enzymes fungi: production and role from selected white-rot in lignin degradation, *FEMS Microbiology Reviews* 13, 125-135. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1994.tb00039.x>
- Hawksworth, D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, 95, 641 – 655. doi:10. 1016/S0953-7562(09)80810-1
- Hawksworth, D. (2004). Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Studies in Mycology*, 50, 9–18. Recuperado de [https://www.researchgate.net/profile/David\\_Hawksworth/publication/268323410\\_Fungal\\_diversity\\_and\\_its\\_implications\\_for\\_genetic\\_resource\\_collections/links/546ce7b80cf26e95bc3ca8ed.pdf](https://www.researchgate.net/profile/David_Hawksworth/publication/268323410_Fungal_diversity_and_its_implications_for_genetic_resource_collections/links/546ce7b80cf26e95bc3ca8ed.pdf)
- Hernández, A., Alfaro, I. y Arrieta, R. (2003). *Microbiología Industrial*. Recuperado en [https://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdEC&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdEC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- Homolka, L. (2014). Preservation of live cultures of basidiomycetes - Recent methods. *Fungal Biology*, 118, 107-125. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2013.12.002>
- Hoshino, T., Terami, F., Tkachenko, O. B., Tojo, M., & Matsumoto, N. (2010). Mycelial growth of the snow mold fungus, *Sclerotinia borealis*, improved at low water potentials: an adaption to frozen environment. *Mycoscience*, 51(2), 98-103. Recuperado de <http://link.springer.com.sci-hub.cc/article/10.1007/s10267-009-0013-3>
- Hou, H., Zhou, J., Wang, J., Du, C. y Yan, B. (2004). Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decoloration of anthraquinone dye. *Process Biochemistry*, 39, 1415-1419. Recuperado de [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00267-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00267-X)
- Joselau, J. P. y Ruel, K. (Eds.). (1994). *Wood polysaccharides and their degradation by fungi, in O. Petrini and G.B. Oullette, Host Wall Alterations by Parasitic Fungi*. Minnesota St. Paul: APS Press.
- Kent, T. y Chang, H. (2013). *Biotechnology in Pulp and Paper Manufacture: Applications and Fundamental Investigations*, Recuperado de [https://books.google.com.ec/books?id=b98gBQAAQBAJ&printsec=frontcover&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?id=b98gBQAAQBAJ&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- Kerrigan RW. (2005). *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. *Mycologia* 97, 12–24. doi: 10.3852/mycologia.97.1.12

- Khatun K., Mahtab H., Khanam P.A., Sayeed M.A., Khan K.A. (2007). Oyster mushroom reduced blood glucose and cholesterol in diabetic subjects. *Mymensingh Medical Journal*, 16(1), 94–99.
- Kirk, T. y Farrell, R. (1987). Enzymatic “combustión”: the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*, 41, 465-505. doi: 10.1146/annurev.mi.41.100187.002341
- Lemaire, M. (1996). The Cellulosome – an exocellular multiprotein complex specialized in cellulose degradation. *Critical Reviews and Biochemistry and Molecular Biology*, 31, 201-236.
- Lopes, A., Hiura, E., Soares, F., Fonseca, L., Sena, C., Ferraz, C. y Araújo, J. (2015). Predatory Activity of the Fungus *Pleurotus eryngii* on *Ancylostoma caninum* Infective Larvae. *SOJ Vet. Science*, 1(1), 104. Recuperado de <http://www.symbiosisonlinepublishing.com/veterinary-sciences/veterinary-sciences04.pdf>
- Malik, K. (1992). Liquid-drying of micro-organism using a simple apparatus. Recuperado de <http://www.cbs.knaw.nl/News/Category/Online%20protocols>.
- Mallavadhani, U., Sudhakar, A., Sathyanarayana, K., Mahapatra, A., Li, W. y Richard, B. (2006). Chemical and analytical screening of some edible mushrooms. *Food Chem*, 95, 58-64. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.018>
- Mantovani TRD, Macarini LK, Glowacki SAF, Haurani MN, Takakua FC, D’Agostini EC, Tanaka HS, Valle JS, Paccola-Meirelles LD, Linde GA, Colauto NB. (2008). Criopreservação do genero *Pleurotus* a -20°C e a -70°C. *Arq Cience Vet Zool Unipar* 11,107–112.
- Mata G, Pérez-Merlo RP. (2003). Spawn viability in edible mushrooms alter freezing in liquid nitrogen without a cryoprotectant. *Cryobiology*, 47, 14–20. Recuperado de <http://www.fungifun.org/docs/mushrooms/Spawn%20viability%20in%20edible%20mushrooms%20after%20freezing%20in%20liquid%20nitrogen%20without%20a%20cryoprotectant.pdf>
- Molina, J., Montoya, J., Wilches, J. y Benítez, M. (2013). *Principios básicos sobre el cultivo del hongo comestibles Pleurotus spp.* Santiago de Cali: Universidad Autónoma de Occidente.
- Montavani, T., Tanaka, H., Harue, S., Zaghi, L., Silveira, J., Paccola, L., Linde, G. y Barros, N. (2012). Cryopreservation at -20 and -70°C of *Pleurotus ostreatus* on grains. *Indian Journal of Microbiology*, 52, 484–488. doi: 10.1007/s12088-012-0289-4
- Montoya, A. (2008). Actividad enzimática, degradación de residuos sólidos orgánicos y generación de biomasa útil del macromiceto *Grifola frondosa* (Tesis de maestría en Ingeniería química). Universidad Nacional de Colombia, Manizales, Colombia.

- Moreno, H., Martínez, A. & Fujimoto, Y. (2011). Aislamiento e identificación de dos esteroides y triterpenoides del cuerpo fructífero de *Ganoderma lucidum* cultivado en Colombia. *Vitae*, 18(1), 11-15. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169822667002>
- Moreno, N. y Ospina, X. (2008). Evaluación de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción de Negro Reactivo 5 empleando *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en fique (Tesis de grado en Microbiología industrial). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Nakasone, K., Peterson, S. y Jong, S. (2011). Preservation and distribution of fungal cultures. En Foster, M., Bills, G. y Mueller, G. (Eds.) *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods* (pp. 37-47). Burlington: Elsevier Academic Press.
- Oei, P. (2016). *Mushroom Cultivation IV appropriate technology for mushroom growers*. Amsterdam: ECO Consult Foundation.
- Pacheco, M., Palacios, G. y Vásquez, J. (1998). Híbridos termoresistentes del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. *Quehacer científico en Chiapas*, 1(2), 37-46. Recuperado en [http://www.dgip-prov.unach.mx/images/pdf-REVISTAQUEHACERCIENTIFICO/QUEHACER-CIENTIFICO-1998agosto/HIBRIDOS\\_TERMORRESISTENTES\\_DEL\\_HONGO.pdf](http://www.dgip-prov.unach.mx/images/pdf-REVISTAQUEHACERCIENTIFICO/QUEHACER-CIENTIFICO-1998agosto/HIBRIDOS_TERMORRESISTENTES_DEL_HONGO.pdf)
- Paterson, R.R.M. (2007). *Ganoderma* disease of oil palm - A white rot perspective necessary for integrated control. *Crop Protection* 26, 1369-1376.
- Pepijn, P. (2010). Composición química de diversos materiales lignocelulósicos de interés industrial y análisis estructural de sus ligninas (Tesis de maestría en Química). Instituto de Recursos Naturales y Agro biología de Sevilla, Sevilla, España.
- Pinzón, C. (2004). Implementación de un biorreactor de lecho fijo operado con pulsaciones de aire y oxígeno empleando *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en espuma de poliuretano para reducir el color de efluentes provenientes de la industria papelera (Tesis de Maestría de Microbiología Industrial). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Pohleven, J., Korošec, T. y Gregori, A. (2016). *Medicinal mushrooms*. Podkoren: MycoMedica.
- Powell, M. (2010). *Medicinal Mushrooms A Clinical Guide*. Recuperado de [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=2xdBgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT9&dq=Medicinal+Mushrooms+A+Clinical+Guide.+powell&ots=x1v0Buc\\_vS&sig=N57Y8uOCM827jHIXbDJG6JIGLy4#v=onepage&q=Medicinal%20Mushrooms%20A%20Clinical%20Guide.%20powell&f=false](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=2xdBgAAQBAJ&oi=fnd&pg=PT9&dq=Medicinal+Mushrooms+A+Clinical+Guide.+powell&ots=x1v0Buc_vS&sig=N57Y8uOCM827jHIXbDJG6JIGLy4#v=onepage&q=Medicinal%20Mushrooms%20A%20Clinical%20Guide.%20powell&f=false)



- Prado, M., Anzaldo, J., Becerra, B., Palacios, H., Vargas, J. y Rentería, M. (2012). Caracterización de hojas de mazorca de maíz y bagazo de caña para la elaboración de una pulpa celulósica mixta. *Madera y Bosques*, 18(3), 37-51.
- Richter, D. (2008). Revival of saprotrophic and mycorrhizal basidiomycete cultures after 20 years in cold storage in sterile water. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(8), 595-599. doi: 10.1139/W08-049
- Ryan, M., Smith, D. y Jeffries, P. (2000). A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 183-186. doi: 10.1023/A:1008910006419
- Rodríguez, J. (2015). Acción degradativa de hongos basidiomycetes sobre residuos agroindustriales de cultivos de café y plátano (Maestría en microbiología agroindustrial). Universidad Católica de Caldas, Manizales, Colombia.
- Ryvarden, L. (2004). Studies in neotropical polypores 2: a preliminary key to neotropical species of *Ganoderma* with a laccate pileus. *Mycologia*, 92, 180-191.
- Salazar, A., Barnes, C. y Ordóñez, M. (2016). *Ganoderma ecuadoriense*. *Fungal Planet*, 461, 441. Recuperado de <http://www.fungalplanet.org/content/pdf-files/FungalPlanet461.pdf>
- Sánchez, R., Gutiérrez, A., Muñoz, A. y Rivera Barrero, C. (2010). Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lignocelulósicos. *Revista Tumbaga*, 5, 61-91.
- Schwarze, F.W.M.R., J. Engels, y C. Mattheck. (2000). *Fungal Strategies of Wood Decay in Trees*. New York: Springer.
- Sjostrom, E. (1993). Wood Chemistry: Fundamentals and Applications. Recuperado de [https://books.google.com.ec/books?id=Sv3xcS6eS5QC&dq=-+Sjostrom,+ \(1993\). +Fundamentals+and+Applications+of+Woods+chemistry.+Woods+chemistry&lr=&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.com.ec/books?id=Sv3xcS6eS5QC&dq=-+Sjostrom,+ (1993). +Fundamentals+and+Applications+of+Woods+chemistry.+Woods+chemistry&lr=&hl=es&source=gbs_navlinks_s)
- Singh, SK, Upadhyay RC, Yadav MC. y Tiwari, M. (2004). Development of a novel lyophilization protocol for preservation of mushrooms mycelial cultures. *Current Science*, 87(5), 568-570. Recuperado de <http://www.iisc.ernet.in/~currsci/sep102004/568.pdf>
- Stamets, P. (2000). *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. 3ª edición. Nueva York: Ten Speed Press.
- Tsai, S.Y., Tsai H.L. y Mau, J.L. (2007). Antioxidant properties of *Agaricus blazei*, *Agrocybe cylindracea*, and *Boletus edulis*. *LWT.*, 40, 1392–1402. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2006.10.001>

- Veena SS. & MeeraP. 2010 – A simple method for culture conservation of some commercial mushrooms. *Mycosphere* 1(3), 191–194.
- Wachtel-Galor S., Yuen J., Buswell J.A., Benzie I.F.F. (2011). *Ganoderma lucidum* (lingzhi or reishi) a medicinal mushroom. Herbal medicine: Biomolecular and clinical aspects. 2ª edición. Benzie: CRC Press.
- Wang, BC., Lin, CT. y Jong SC. (1990). Investigation on preservation of *Agaricus bisporus* and some other mushrooms. *Mushroom Journal of the Topics*, 10, 1-8.
- Wang, D., Wu, S., Su, C, Peng, J, Shih, Y. y Chen, L. (2009). *Ganoderma multipileum*, the correct name for '*G. lucidum*' in tropical Asia. *Botanical Studies* 50, 451-458.
- Wasser SP, Didukh MY, Amazonas MALA, Nevo E, Stamets P, Eira AF. (2002). Is a widely cultivated culinary-medicinal royal sun *Agaricus* (the himematsutake mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murrill? *International Journal of Medicinal Mushrooms* 4, 267–290. doi: 10.1615/IntJMedMushr.v4.i4.10
- WFCC, World Federation for Culture Collections. (2010). Guidelines for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. Recuperado de <http://www.wfcc.info/guidelines/>
- Wyman, C., Decker, S., Himmel, M., Brady, J., Skopec, C. y Viikari, L. (2005). Hydrolysis of Cellulose and Hemicellulose. En *Polyssacharides* (995-1000). Usa: Library of Congress.
- Zhou XW, Lin J, Yin YZ, Zhao JY. (2007). Ganodermataceae: natural products and their related pharmacological functions. *The American Journal of Chinese Medicine*, 35(4), 559-574.

## 8. FIGURAS



**A.**

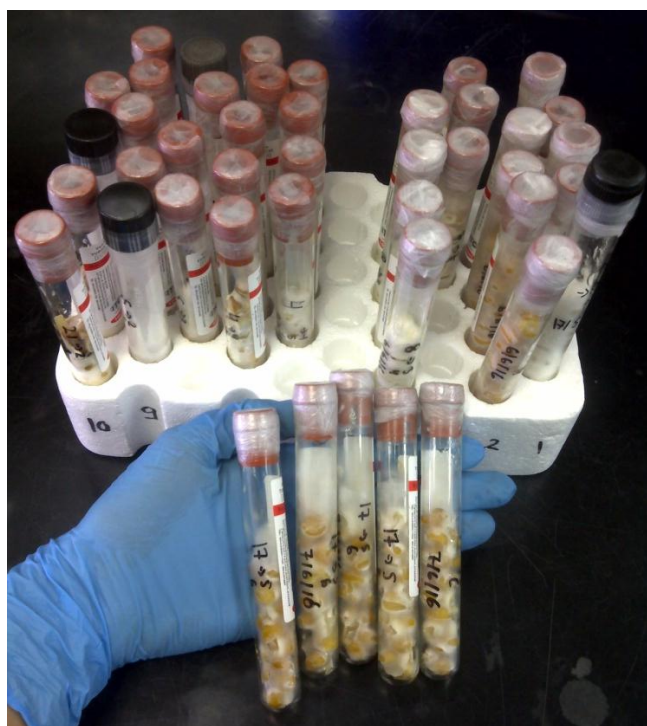
**B.**

**Figura 1. Colonización del micelio en granos de cebada. A.** Tubo de ensayo recién inoculado con la cepa, **B.** Tubo de ensayo completamente colonizado por micelio después de ser incubado a las condiciones óptimas.



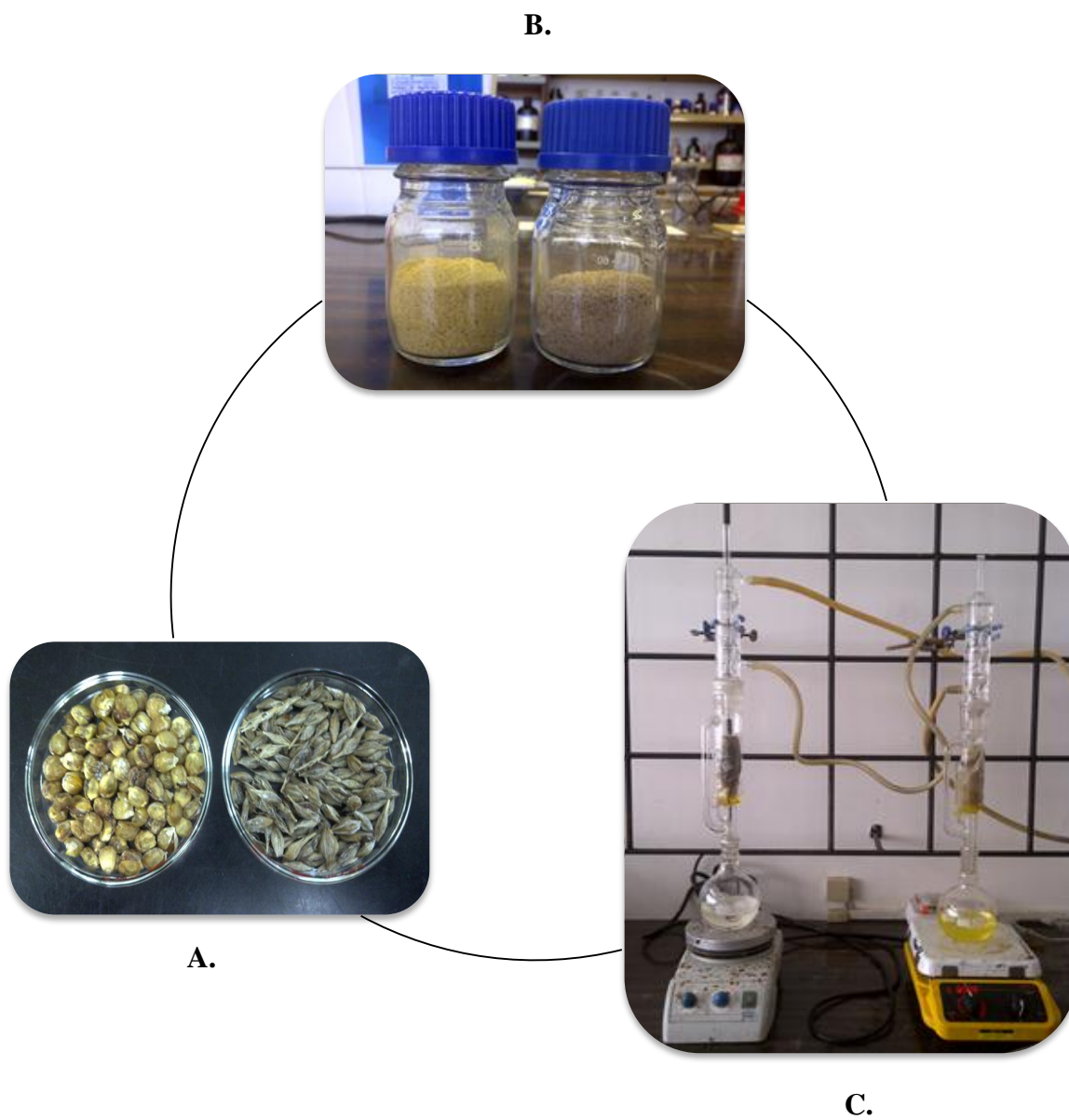
A.

B.

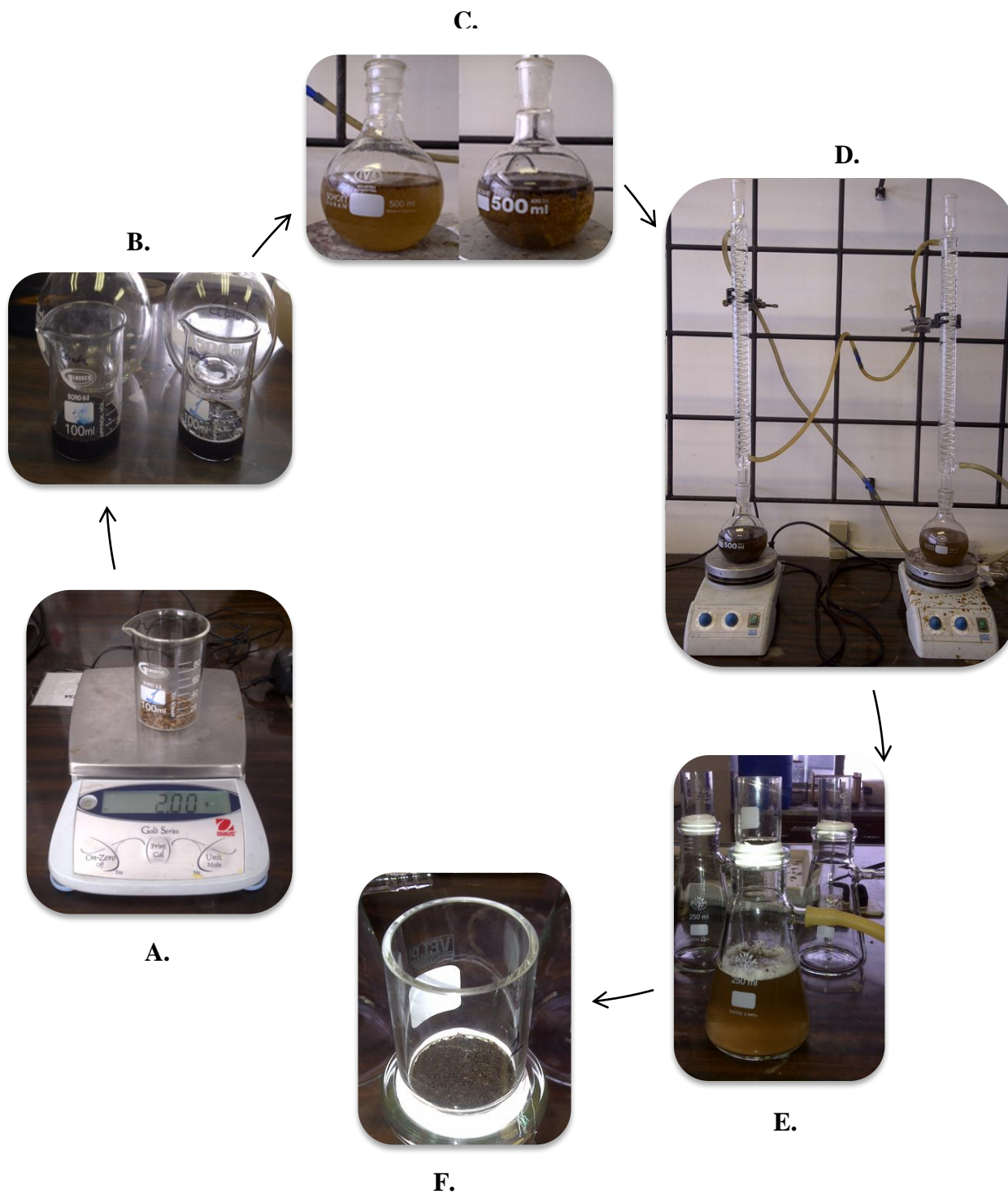


C.

**Figura 2. Cultivo miceliar listo para ser almacenado a 4°C y -80°C. A.** Tubo de ensayo a ser almacenado a 4°C, **B.** Criovial a ser almacenado a -80°C, **C.** Cepas almacenadas a 4°C.

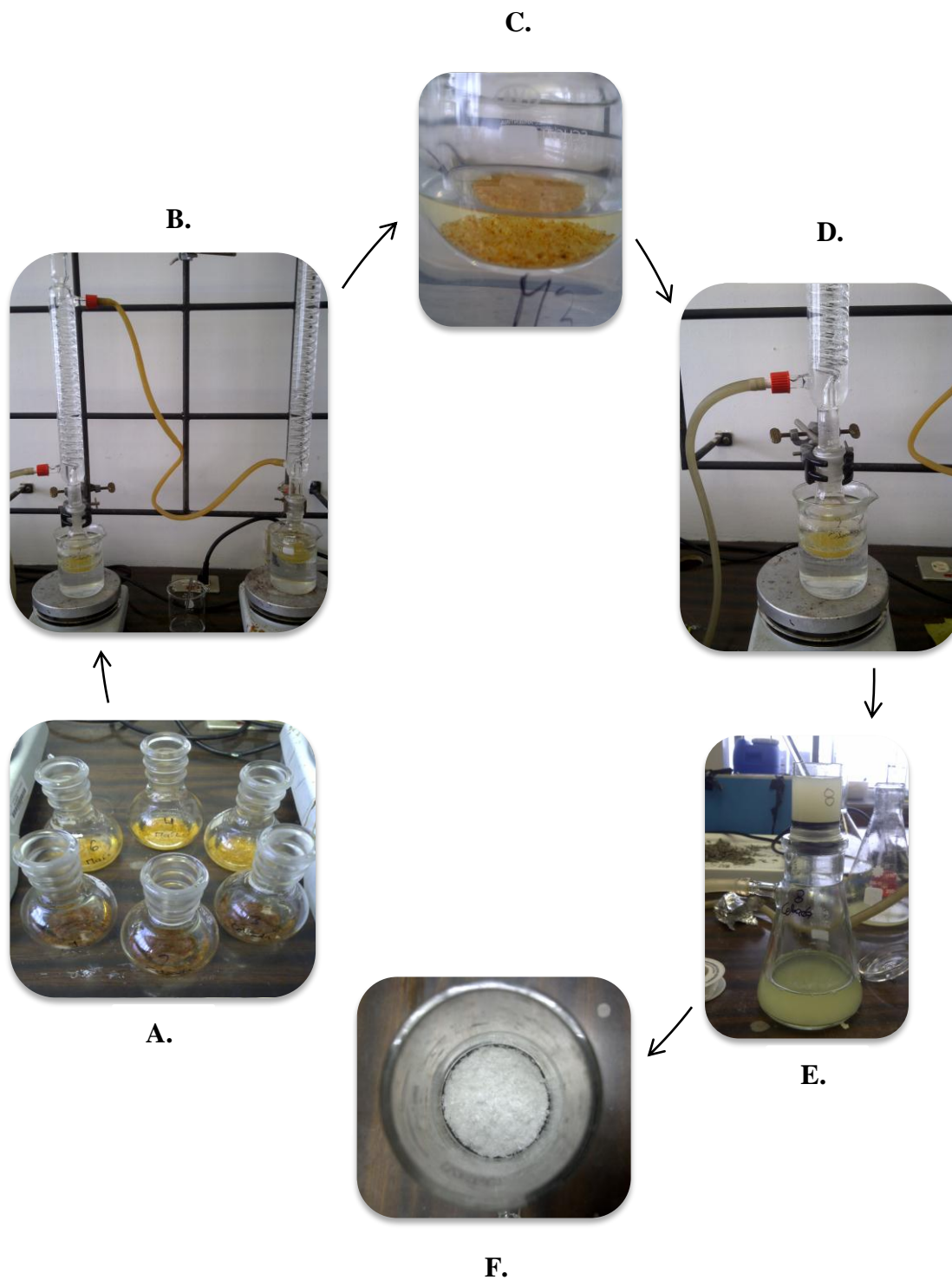


**Figura 3. Preparación de muestra libre de extraíbles.** A. Granos secados después de aplicar la metodología para preparación de sustrato, B. Granos molidos, C.Extracción Soxhlet.



**Figura 4. Determinación de lignina.** A. Muestra pesada libre de extraíbles, B. Tratamiento con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 72%, C. Dilución al 3% con agua destilada, D. Reflujo por 4 horas, E. Filtrado, F. Lignina obtenida.



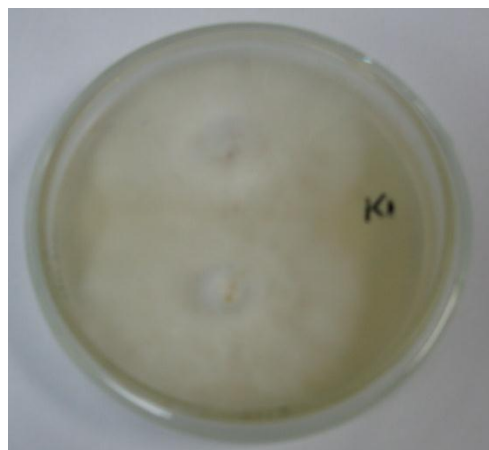
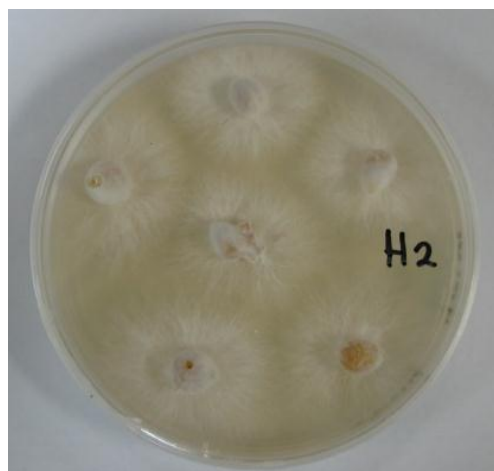


**Figura 5. Determinación de Celulosa.** A. Muestra libre de extraíbles pesada con solución etanol-ácido nítrico , B. Reflujo en baño Maria con la solución preparada, C. Decantación, D. Reflujo con agua destilada, E. Lavado con agua destilada y acetato, F. Celulosa obtenida.

A.



B.



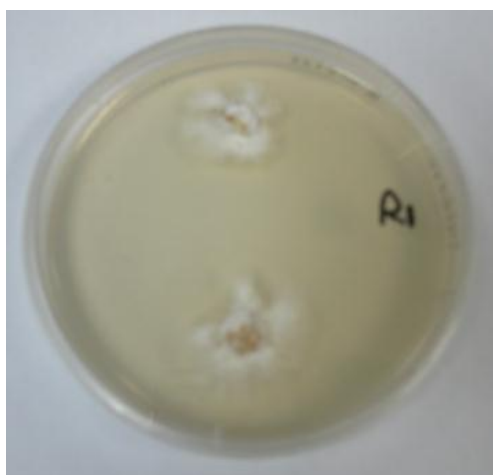
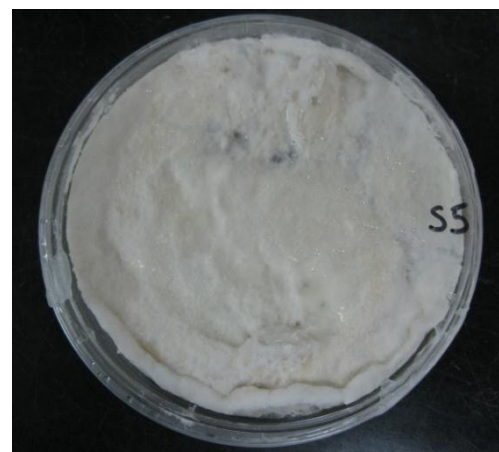
**Figura 6. Cultivo miceliar a las 96 y 336 horas de las cepas J16, H8, K17. Columna A. 96 horas, Columna B. 336 horas.**



A.



B.

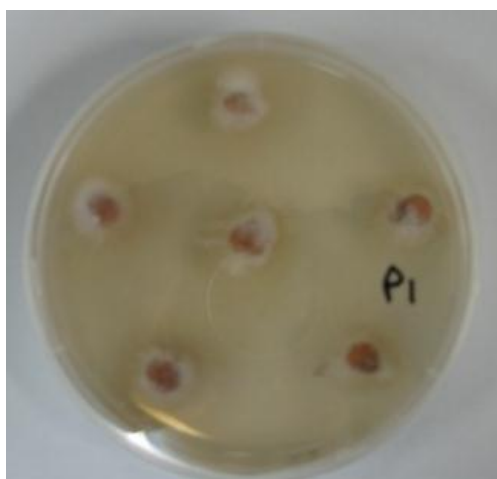
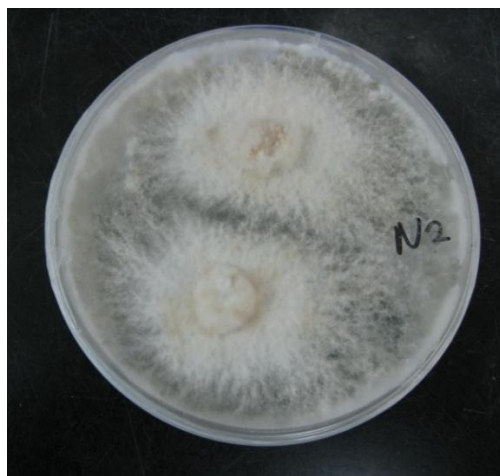


**Figura 7. Cultivo miceliar a las 96 y 336 horas de las cepas L18, S21, R22. Columna A. 96 horas, Columna B. 336 horas.**

A.

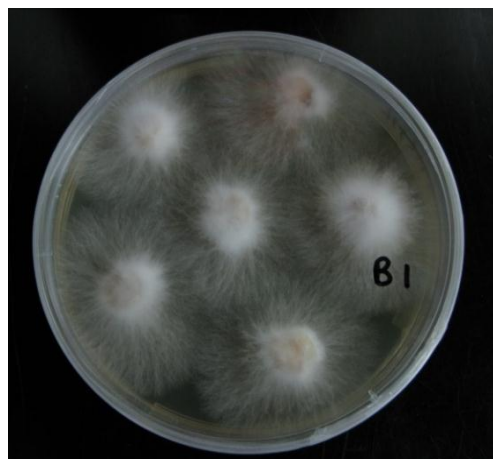


B.

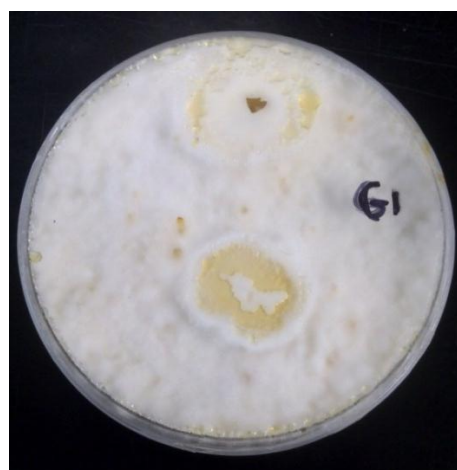
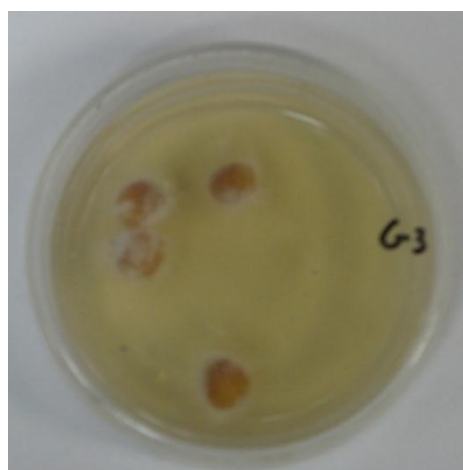
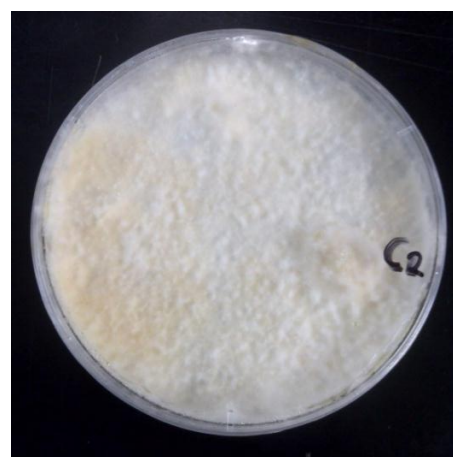
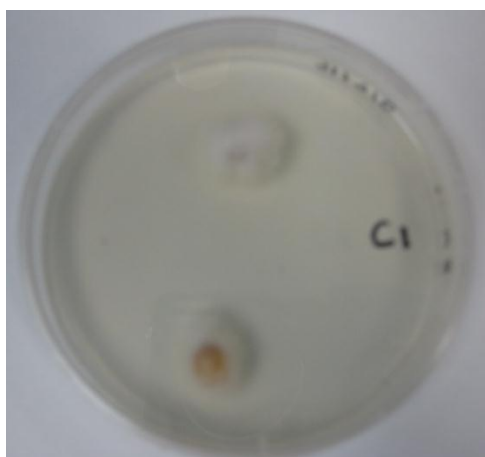


**Figura 8. Cultivo micelial a las 96 y 336 horas de las cepas N9, P14, A3. Columna A. 96 horas, Columna B. 336 horas.**

A.



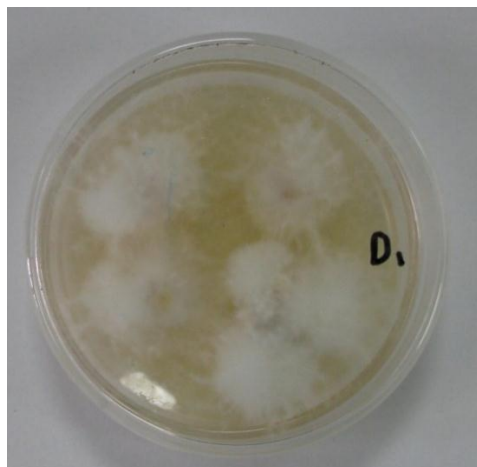
B.



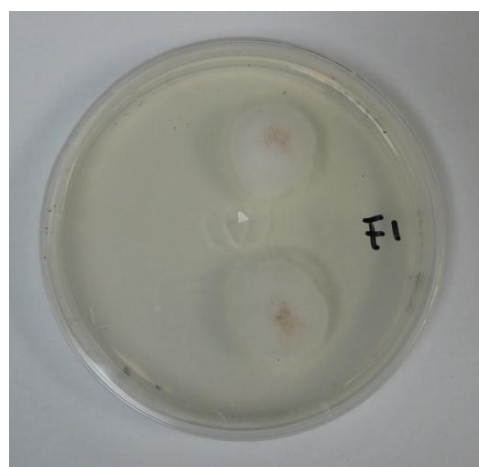
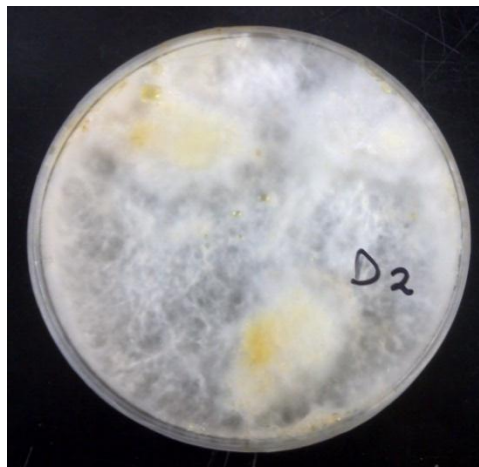
**Figura 9. Cultivo miceliar a las 96 y 336 horas de las cepas B4, C5, G11. Columna A. 96 horas, Columna B. 336 horas.**



A.

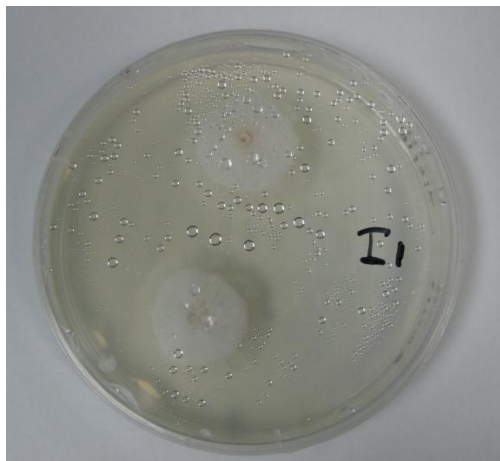


B.

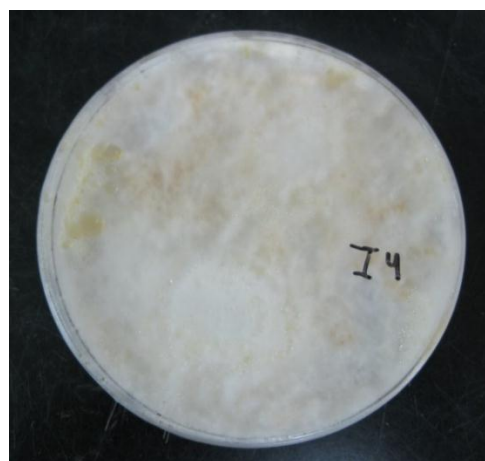


**Figura 10. Cultivo miceliar a las 96 y 336 horas de las cepas D6, E7, F10. Columna A. 96 horas, Columna B. 336 horas.**

A.



B.



**Figura 11. Cultivo miceliar a las 96 y 336 horas de las cepas I20, M1, O13. Columna A. 96 horas, Columna B. 336 horas.**

## 9. TABLAS

**Tabla 1. Lista de las especies comerciales y ecuatorianas con su código de cepa, hábitat, morfología del crecimiento miceliar y nutrición.**

<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>	<b>Hábitat</b>	<b>Morfología del crecimiento miceliar</b>	<b>Nutrición</b>
<i>Ganoderma applanatum</i>	R22*	Tropical	Linear, blanco, con la edad se vuelven de amarillo a café, presentando surcos que se extienden desde el punto de inoculación hacia el exterior.	Saprófito, principalmente parásito <sup>3</sup>
<i>Ganoderma applanatum</i>	S21*	Tropical	Linear, blanco, con la edad se vuelven de amarillo a café, presentando surcos que se extienden desde el punto de inoculación hacia el exterior.	Saprófito, principalmente parásito <sup>3</sup>
<i>Ganoderma ecuadoriense</i>	L18*	Tropical <sup>4</sup>	Blanco, radial, algodonoso, con el tiempo se forma una sola capa, con pigmentación amarilla o café.	Saprófito, principalmente parásito <sup>4</sup>
<i>Ganoderma lucidum</i>	H8	Tropical y temperado <sup>1</sup>	Blanco, radial, no aéreo inicialmente, después se hace densamente enmarañado y apretado, cambia de color a amarillo y dorado, a menudo, zonal con la edad <sup>1</sup>	Saprófito, principalmente parásito <sup>1</sup>
<i>Ganoderma lucidum</i>	J16	Tropical y temperado <sup>1</sup>	Blanco, radial, no aéreo inicialmente, después se hace densamente enmarañado y apretado, cambia de color a amarillo y dorado, a menudo, zonal con la edad <sup>1</sup>	Saprófito, principalmente parásito <sup>1</sup>
<i>Ganoderma parvolum</i>	K17*	Tropical <sup>2</sup>	Blanco, radial, no aéreo al principio, después se forma una sola capa gruesa, a veces de color amarillo.	Saprófito, principalmente parásito <sup>2</sup>

**Tabla 1. Lista de las especies comerciales y ecuatorianas con su código de cepa, hábitat, morfología del crecimiento micelial y nutrición (continuación...).**

<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>	<b>Hábitat</b>	<b>Morfología del crecimiento micelial</b>	<b>Nutrición</b>
<i>Hypsizygus ulmarius</i>	A3	Temperado <sup>1</sup>	Blanco, algodonoso <sup>1</sup>	Saprófito <sup>1</sup>
<i>Lentinula edodes</i>	N9	Temperado <sup>1</sup>	Blanco y linear al inicio, con la edad se hace algodonoso-aéreo, rara vez se vuelve rizomórfico <sup>1</sup>	Saprófito <sup>1</sup>
<i>Lentinula edodes</i>	P14	Temperado <sup>1</sup>	Blanco y linear al inicio, con la edad se hace algodonoso-aéreo, rara vez se vuelve rizomórfico <sup>1</sup>	Saprófito <sup>1</sup>
<i>Pleurotus citrinopiliatus</i>	B4	Tropical <sup>1</sup>	Blanco y esponjoso, a veces con rizomorfos, mechones de crecimiento denso, a veces con tonos amarillentos <sup>1</sup>	Saprófito <sup>1</sup>
<i>Pleurotus djamor</i>	M1	Tropical <sup>1</sup>	Blanco y linear, se hace rosado, rizomorfos largos y divergentes, algodonoso y aéreo con la madurez, primordios <sup>1</sup>	Saprófito <sup>1</sup>
<i>Pleurotus djamor</i>	O13	Tropical <sup>1</sup>	Blanco y linear, se hace rosado, rizomorfos largos y divergentes, algodonoso y aéreo con la madurez, primordios <sup>1</sup>	Saprófito <sup>1</sup>
<i>Pleurotus eryngii</i>	C5	Temperado <sup>1</sup>	Blanco, radial, a veces rizomórfico, se vuelve espeso y algodonoso en la madurez <sup>1</sup>	Saprófito o parasito facultativo <sup>1</sup>
<i>Pleurotus eryngii</i>	G11	Temperado <sup>1</sup>	Blanco, radial, a veces rizomórfico, se vuelve espeso y algodonoso en la madurez <sup>1</sup>	Saprófito o parasito facultativo <sup>1</sup>

**Tabla 1. Lista de las especies comerciales y ecuatorianas con su código de cepa, hábitat, morfología del crecimiento micelial y nutrición (continuación).**

<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>	<b>Hábitat</b>	<b>Morfología del crecimiento micelial</b>	<b>Nutrición</b>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	D4	Tropical y temperado <sup>1</sup>	Blanco, radial, se hace algodonoso, cuando envejece forma una capa de micelio gruesa, exudado de color amarillo a naranja <sup>1</sup>	Saprófito y en ocasiones parasito facultativo <sup>1</sup>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	E7	Tropical y temperado <sup>1</sup>	Blanco, radial, se hace algodonoso, cuando envejece forma una capa de micelio gruesa, exudado de color amarillo a naranja <sup>1</sup>	Saprófito y en ocasiones parasito facultativo <sup>1</sup>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	F10	Tropical y temperado <sup>1</sup>	Blanco, radial, se hace algodonoso, cuando envejece forma una capa de micelio gruesa, exudado de color amarillo a naranja <sup>1</sup>	Saprófito y en ocasiones parasito facultativo <sup>1</sup>
<i>Pleurotus ostreatus</i>	I20	Tropical y temperado <sup>1</sup>	Blanco, radial, se hace algodonoso, cuando envejece forma una capa de micelio gruesa, exudado de color amarillo a naranja <sup>1</sup>	Saprófito y en ocasiones parasito facultativo <sup>1</sup>

\* Cepa ecuatoriana; <sup>1</sup> Stamets, 2000; <sup>2</sup> Ryvardeen, 2004; <sup>3</sup> Patterson, 2007; <sup>4</sup> Salazar, Barnes y Ordóñez, 2016.



**Tabla 2. Grupos formados por cepas de acuerdo al grano, temperatura y tiempo en que fueron almacenadas**

<b>Grupo 1</b>	<b>Grupo 2</b>	<b>Grupo 3</b>	<b>Grupo 4</b>
<b>Maíz</b>	<b>Maíz</b>	<b>Maíz y cebada</b>	<b>Maíz y cebada</b>
<b>4°C y -80°C</b>	<b>4°C y -80°C</b>	<b>4°C</b>	<b>4°C</b>
<b>2 y 10 meses</b>	<b>2 y 5 meses</b>	<b>10 meses</b>	<b>12 meses</b>
K17	H8	A3	K17
L18	J16	B4	L18
S21	R22	C5	
C5	N9	D4	
E7	P14	E7	
I20	G11	I20	
B4	F10		
A3	O13		
M1			

**Tabla 3. Análisis, diseño y prueba estadística aplicada para los datos de la tasa de crecimiento miceliar por día de cada cepa del grupo 1 y 2, después de ser almacenadas a las temperaturas de 4°C y -80°C por 2, 5 y 10 meses.**

Grupo 1			Grupo 2		
Cepa	Análisis estadístico	Diseño y prueba estadística	Cepa	Análisis estadístico	Diseño y prueba estadística
<b>K17</b>	No paramétrico	Kruskal-Wallis y Mann-Whitney	<b>H8</b>	No paramétrico	Kruskal-Wallis y Mann-Whitney
<b>L18</b>	Paramétrico	Factorial 2x2 en DCA	<b>J16</b>	Paramétrico	Factorial 2x2 en DCA
<b>S21</b>	No paramétrico	Kruskal-Wallis y Mann-Whitney	<b>R22</b>	No paramétrico	Kruskal-Wallis y Mann-Whitney
<b>C5</b>	No paramétrico	Kruskal-Wallis y Mann-Whitney	<b>N9</b>	No paramétrico	Kruskal-Wallis y Mann-Whitney
<b>E7</b>	Paramétrico	Factorial 2x2 en DCA	<b>P14</b>	Paramétrico	Factorial 2x2 en DCA
<b>I20<sup>T</sup></b>	Paramétrico	Factorial 2x2 en DCA	<b>G11</b>	No paramétrico	Kruskal-Wallis y Mann-Whitney
<b>B4</b>	No paramétrico	Kruskal-Wallis y Mann-Whitney	<b>F10</b>	Paramétrico	Factorial 2x2 en DCA
<b>A3<sup>T</sup></b>	Paramétrico	Factorial 2x2 en DCA	<b>O13</b>	Paramétrico	Factorial 2x2 en DCA
<b>M1</b>	No paramétrico	Mann-Whitney			

T. Transformación logarítmica de datos.

**Tabla 4. Viabilidad y pureza de las cepas del grupo 1 después de ser almacenadas a las temperaturas de 4°C y -80°C por 2 y 10 meses.**

Temperatura		4°C		-80°C	
Cepa	Mes	2	10	2	10
<b>K17</b>		+/- *	+/- (6)	+ *	+
<b>L18</b>		-	+	+ *	+
<b>S21</b>		-	+	+/- (4)	+
<b>C5</b>		+	+ *	+ *	+ *
<b>E7</b>		+	+	+	+
<b>I20</b>		+	+	+	+
<b>B4</b>		+	+	+	+ *
<b>A3</b>		+	+	+	+
<b>M1</b>		NP	-	NP	+
<b>D4</b>		NP	+	NP	NP

+, Viabilidad positiva: hubo crecimiento miceliar; -, viabilidad negativa: no hubo crecimiento miceliar; +/-, casos en los que distintos aislados crecieron y no crecieron; \*, contaminación; (#) días a los que se apreció crecimiento miceliar fuera del rango de 24 a 72 horas; NP, no fue probado.

**Tabla 5. Viabilidad y pureza de las cepas del grupo 2 después de ser almacenadas a las temperaturas de 4°C y -80°C por 2 y 5 meses.**

Temperatura		4°C		-80°C	
Cepa	Mes	2	5	2	5
<b>H8</b>		+ *	+*	+*	+ E
<b>J16</b>		+	+	+	+
<b>R22</b>		+/-	-	+	+ (4)
<b>N9</b>		+/-	+/-	+ (5,6)	+ (4,5)
<b>P14</b>		+	+	+	+
<b>G11</b>		+ *	+	+ *	+/-
<b>F10</b>		+	+	+	+
<b>O13</b>		+	+	+	+

+, Viabilidad positiva: hubo crecimiento miceliar; -, viabilidad negativa: no hubo crecimiento miceliar; +/-, casos en los que distintos aislados crecieron y no crecieron; \*, contaminación; (#) días a los que se apreció crecimiento miceliar fuera del rango de 24 a 72 horas.

**Tabla 6. Viabilidad y pureza de las cepas almacenadas a 4°C por 10 meses (grupo 3) y 12 meses (grupo 4) en granos de maíz y cebada.**

Mes	Tipo de grano		Maíz	Cebada
	Cepas			
10	A3		+	-
	B4		+	+
	C5		+*	+
	D4		+	+
	E7		+(4)	+
	I20		+	+
12	K17		+/-	+
	L18		+ *	+

+, Viabilidad positiva: hubo crecimiento miceliar; -, viabilidad negativa: no hubo crecimiento miceliar; +/-, casos en los que distintos aislados crecieron y no crecieron; \*, contaminación; (#) días a los que se apreció crecimiento miceliar fuera del rango de 24 a 72 horas.

**Tabla 7. Promedio de la tasa de crecimiento miceliar por día (mm) de las cepas del grupo 1 después de ser almacenadas a las temperaturas de 4°C y -80°C por 2 y 10 meses.**

Temperatura		4°C		-80°C	
Cepa	Mes	2	10	2	10
<b>K17</b>		4,48	6,25	15,17	12,02
<b>L18</b>		0,00	5,77	13,33	9,00
<b>S21</b>		0,00	5,42	3,44	5,11
<b>C5</b>		9,18	8,22	8,35	5,74
<b>E7</b>		7,26	5,90	9,96	11,50
<b>I20</b>		7,81	10,04	9,14	10,48
<b>B4</b>		10,46	8,93	9,79	7,32
<b>A3</b>		12,03	6,91	8,30	8,52
<b>M1</b>		NP	0,00	NP	10,19

NP, no fue probado.

**Tabla 8. Promedio de la tasa de crecimiento miceliar por día (mm) de las cepas del grupo 2 después de ser almacenadas a las temperaturas de 4°C y -80°C por 2 y 5 meses.**

Temperatura		4°C		-80°C	
Cepa	Mes	2	5	2	5
<b>H8</b>		12,36	10,61	10,70	12,98
<b>J16</b>		8,39	16,72	11,53	12,29
<b>R22</b>		2,48	0,00	5,56	6,73
<b>N9</b>		2,90	3,25	6,36	3,98
<b>P14</b>		6,90	5,82	6,99	5,47
<b>G11</b>		9,00	6,80	7,36	8,97
<b>F10</b>		10,30	7,80	9,56	10,93
<b>O13</b>		7,40	9,67	8,84	9,75

**Tabla 9. Resultado del análisis estadístico paramétrico independiente por cepa para la tasa de crecimiento miceliar por día de las cepas del grupo 1 y 2 después de ser almacenadas a las temperaturas de 4°C y -80°C por 2, 5 y 10 meses.**

Grupo	Cepa	Significación estadística			Media	CV (%)
		p T°	p Mes	p Interacción		
<b>1</b>	<b>L18</b>	0,000**	0,378	0,000**	7,02	20,57
	<b>E7</b>	0,000**	0,898	0,059	8,66	16,29
	<b>I20<sup>T</sup></b>	0,423	0,252	0,817	9,37	10,44
	<b>A3<sup>T</sup></b>	0,5	0,042*	0,052	8,94	11,20
<b>2</b>	<b>J16</b>	0,264	0,000**	0,000**	12,23	8,27
	<b>P14</b>	0,702	0,002*	0,507	6,30	9,66
	<b>F10</b>	0,125	0,446	0,021*	9,65	14,15
	<b>O13</b>	0,467	0,146	0,516	8,92	20,04

NP, no fue probado logarítmica de datos; \*, diferencias significativas; \*\*, diferencias altamente significativas.



**Tabla 10. Resultado estadístico de las pruebas no paramétricas realizado independientemente por cepa para la tasa de crecimiento miceliar por día de las cepas del grupo 1 después de ser almacenadas a las temperaturas de 4°C y -80°C por 2 y 10 meses.**

Prueba estadística	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney				
	Interacción	p	p T°		p Mes	
	p grupos		2 meses	10 meses	4°C	-80°C
<b>K17</b>	0,008*	0,001*	0,015*	0,034*	0,24	0,48
<b>S21</b>	0,076	0,396	0,121	0,655	0,037*	0,368
<b>C5</b>	0,014*	0,049*	0,086	0,05	0,025*	0,034*
<b>B4</b>	0,008*	0,001*	0,015*	0,034*	0,24	0,48
<b>M1</b>	NR	0,015*	NR		NR	

NR, análisis no realizado; \*, diferencias significativas.

**Tabla 11. Resultado estadístico de las pruebas no paramétricas realizado independientemente por cepa para la tasa de crecimiento miceliar por día de las cepas del grupo 2 después de ser almacenadas a las temperaturas de 4°C y -80°C por 2 y 5 meses.**

Prueba estadística	Kruskal-Wallis	Mann-Whitney				
	Interacción	p	p T°		p Mes	
Cepa	p grupos	Temperaturas	2 meses	5 meses	4°C	-80°C
<b>H8</b>	0,108	0,56	0,154	0,059	0,144	0,074
<b>R22</b>	0,017*	0,002*	0,081	0,028*	0,186	0,468
<b>N9</b>	0,142	0,096	0,024*	0,806	0,751	0,285
<b>G11</b>	0,057	0,807	0,083	0,071	0,055	0,034*

\* Diferencias significativas.

**Tabla 12. Promedio de la tasa de crecimiento miceliar por día de cepas después de ser almacenadas en granos de maíz y cebada, a la temperatura de 4°C por 10 (grupo 3) y 12 meses (grupo 4).**

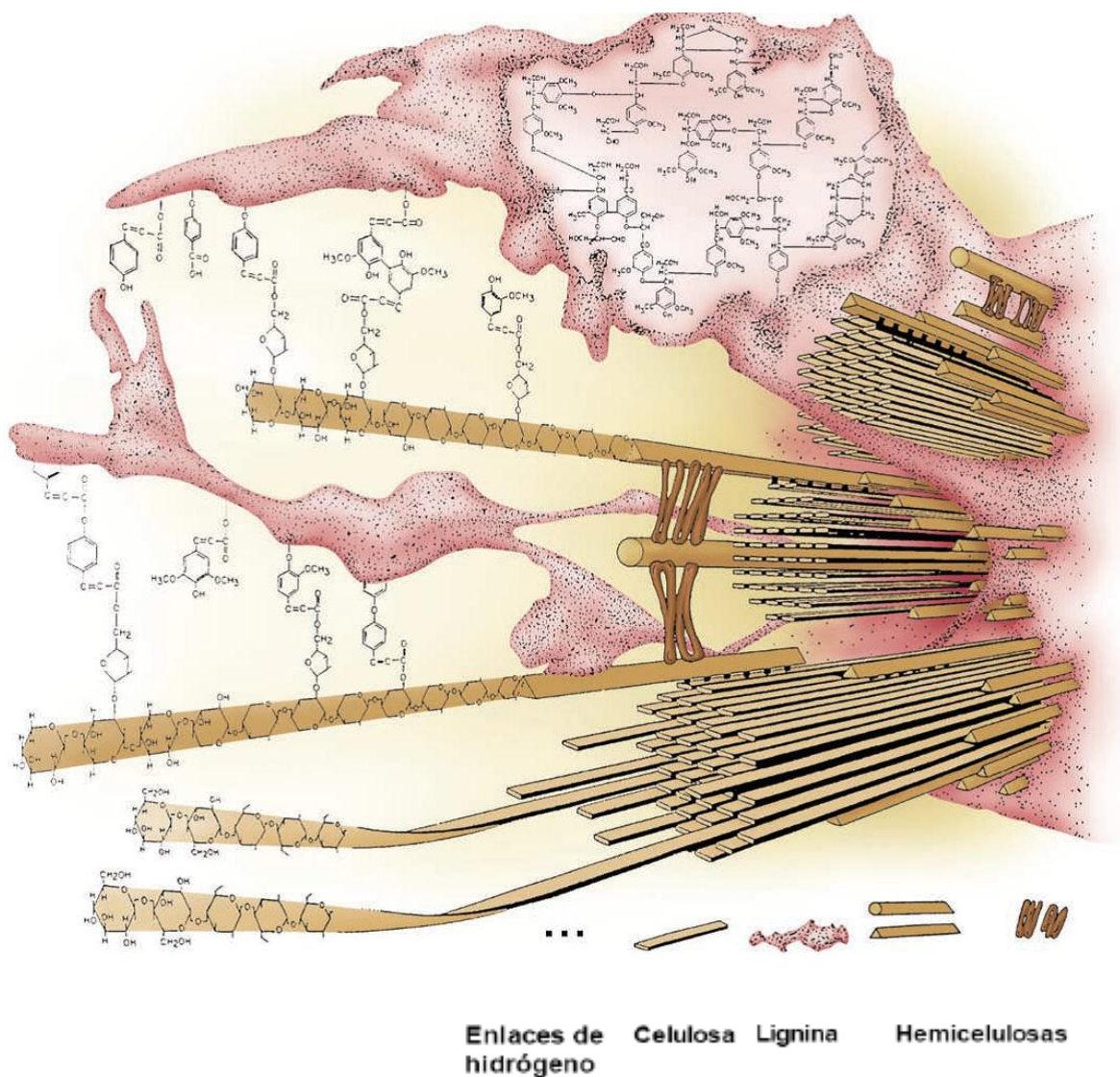
Mes	Tipo de grano		Maíz	Cebada
	Cepas			
10		A3	6,91	0,00
		B4	8,93	6,53
		C5	8,22	7,15
		D4	6,97	7,67
		E7	5,90	9,13
		I20	10,04	8,86
12		K17	5,73	5,07
		L18	2,61	10,27

**Tabla 13. Porcentaje de lignina y celulosa en granos de maíz y cebada.**

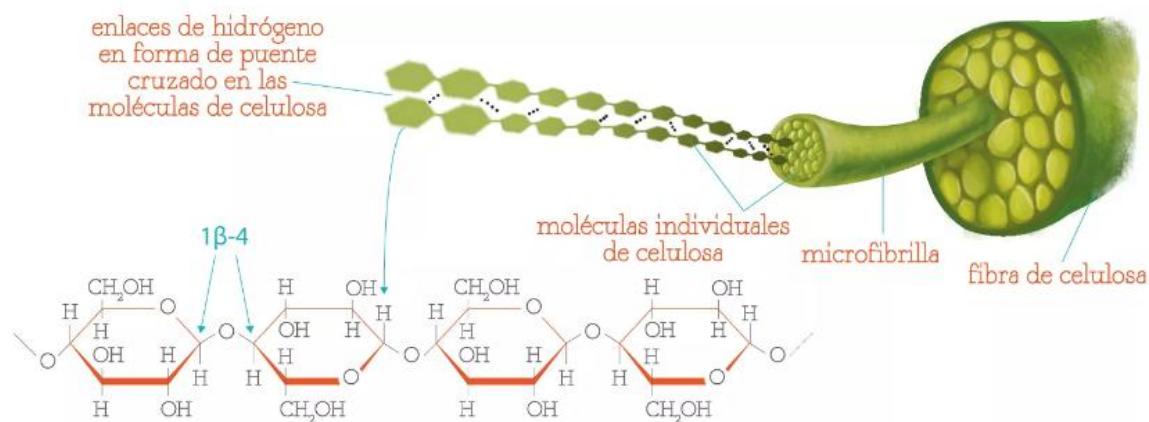
Granos	Repetición	Compuesto	Lignina	Celulosa
Maíz	1		0,44	5,04
	2		0,32	5,79
	3		0,67	5,30
	Promedio		<b>0,48</b>	<b>5,38</b>
Cebada	1		6,39	7,42
	2		6,45	8,89
	3		6,40	6,80
	Promedio		<b>6,41</b>	<b>7,70</b>

## 11. ANEXOS

**Anexo 1. Representación esquemática de la organización estructural de los diferentes biopolímeros de la pared celular de una angiosperma no leñosa (Pepijn, 2010).**

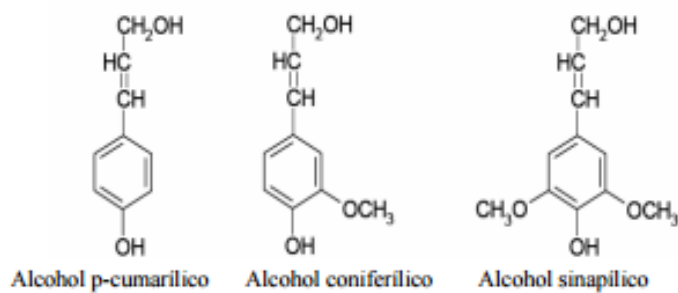


**Anexo 2. Estructura y composición de la fibra de celulosa.** La celulosa, un homopolímero compuesto por unidades de glucosa con enlaces glucosídicos  $\beta$  1-4, formada por estructuras conocidas como microfibrillas, las que a su vez están conformadas por fibrillas elementales formadas de 10000 y 14000 moléculas de glucosa.

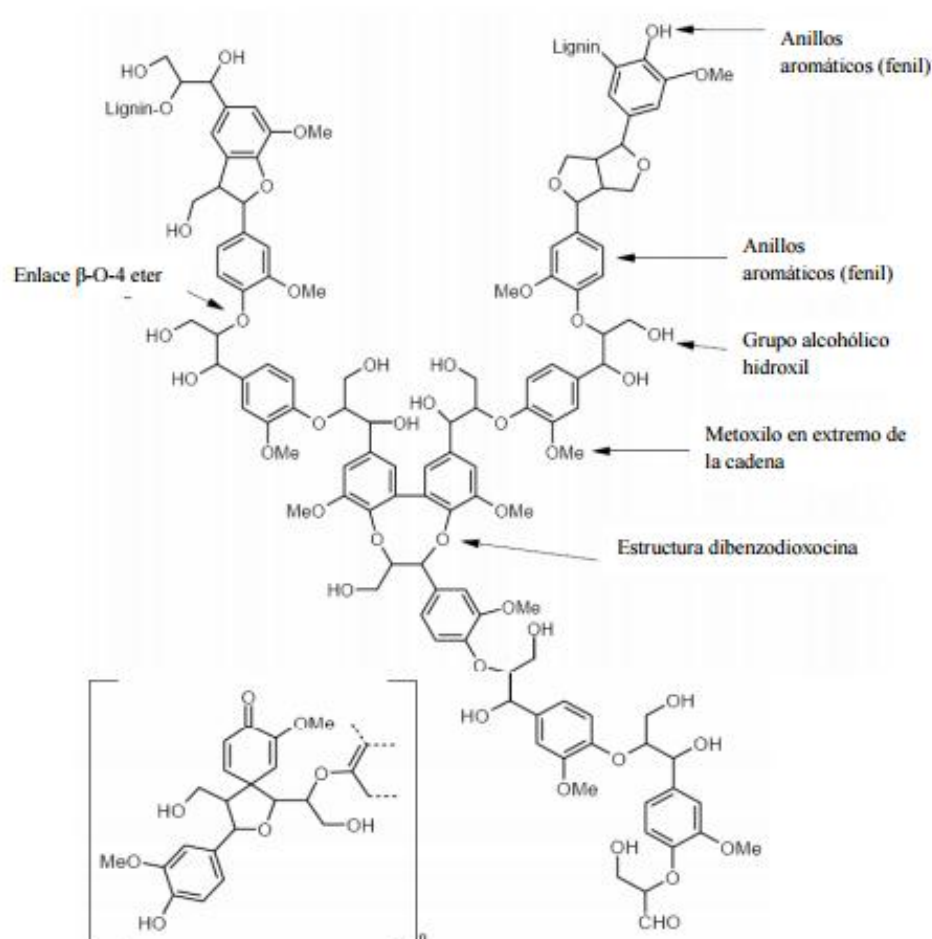


<http://portalacademico.cch.unam.mx/alumno/quimica2/unidad2/carbohidratos/polisacaridos>

**Anexo 3. Estructura de la lignina.** **A.** Monómeros precursores de la molécula de lignina. **B.** Estructura completa de lignina (Montoya, 2008).



**A.**



**B.**